

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

AMÉLIORATION DE LA PRODUCTION ET DE LA QUALITÉ DES PROTÉINES  
THÉRAPEUTIQUES RECOMBINANTES PRODUITES EN CULTURE EN MODE CUVÉE-  
ALIMENTÉE DE CELLULES DE MAMMIFÈRE

ERIC KARENGERA

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR  
(GÉNIE CHIMIQUE)  
AOÛT 2017

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée :

AMÉLIORATION DE LA PRODUCTION ET DE LA QUALITÉ DES PROTÉINES  
THÉRAPEUTIQUES RECOMBINANTES PRODUITES EN CULTURE EN MODE CUVÉE-  
ALIMENTÉE DE CELLULES DE MAMMIFÈRE

présentée par : KARENGERA Eric

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

Mme DESCHÊNES Louise, Ph. D., présidente

M. HENRY Olivier, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. DE CRESCENZO Gregory, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. JOLICOEUR Mario, Ph. D., membre

M. GAILLET Bruno, Ph. D., membre externe

## DÉDICACE

*À mes mamans*

## REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le professeur Olivier Henry, pour m'avoir permis de vivre cette belle expérience en me proposant un projet de recherche dans un domaine stimulant. Merci pour les précieux conseils, les encouragements et les occasions de développement dont j'ai bénéficié au travers des charges de cours et des conférences auxquelles j'ai assisté. Je remercie également mon codirecteur, le professeur Gregory De Crescenzo, pour son support et son soutien. Je le remercie de m'avoir accueilli au sein de son groupe et partagé son expertise dans le domaine analytique qui m'a grandement aidé dans mon projet de recherche. Merci à vous deux de m'avoir épaulé tout au long de cette aventure.

Je remercie aussi le professeur Mario Jolicoeur pour les connaissances qu'il m'a prodigué dans ses cours, pour nos échanges amicaux dans les couloirs du laboratoire ainsi que pour le support matériel qu'il m'a permis de bénéficier. Merci également à Yves Durocher pour son support dans l'avancement de mon projet de recherche.

Ensuite, cette période de doctorat n'aurait pas été si belle sans les nombreux moments d'amitiés qui l'ont parsemée : les sessions de sport du samedi, les soirées jeux de société, les belles randonnées, la chanson à tue-tête dans le labo, les petites soirées resto et tant d'autres agréables moments qui furent de véritables oasis lors des périodes de recherche difficiles et maigres en résultats. Merci à vous les amis : Kahina, Benoît, Yuan, Florian, Adeline, Frédéric, Alina, Nesrine, July, Cyril, Charles, Samantha, Pauline, Xinhe, Xiaojie, Anaïs, Julien et tous les autres.

J'aimerais tout particulièrement remercier ma famille, sans laquelle je ne serais pas là aujourd'hui. Merci à toi, maman, pour ton amour et la grande confiance en moi que tu m'as instillé par tes encouragements et de tes nombreux conseils. Je remercie aussi mes formidables sœurs et mes deux adorables petites nièces.

Merci à toi, Chau Tam Luan, pour m'avoir donné le goût de la lecture, des sciences et de la rigueur dans le travail. Merci de vivre en moi jour après jour grâce aux valeurs et aux principes que tu m'as transmis.

Enfin, merci à toi Emmanuelle, ma fiancée, pour tes encouragements, ton support et ton amour indéfectible pendant ces années. Merci de m'avoir soutenu et motivé dans les moments *down* par tes chansons, ton humour et ta bonne humeur.

## RÉSUMÉ

La production de protéines thérapeutiques recombinantes en cellule de mammifère représente aujourd'hui une part importante des revenus des industries biopharmaceutiques. Des avancées considérables ont été réalisées ces 30 dernières années dans l'amélioration des rendements des cultures, notamment grâce au développement des procédés en mode cuvée-alimentée (*fed-batch*). Cependant, malgré des rendements de plus en plus élevés, la qualité des protéines produites est souvent faible, inconsistante et sujette à une grande variabilité d'une production à l'autre.

La glycosylation est l'attribut de qualité des glycoprotéines considérée comme la plus critique car celle-ci influence de manière significative l'efficacité et l'immunogénicité du biothérapeutique. Plus particulièrement, la sialylation a un impact majeur sur le temps de demi-vie du biothérapeutique dans le sérum sanguin. Pour ces raisons, les agences de régulation tels que la *Food and Drug Administration* (FDA) et l'agence européenne des médicaments (EMA) imposent une caractérisation rigoureuse de la qualité des glycoprotéines, rendant ainsi le contrôle et l'optimisation de la glycosylation un enjeu primordial pour les industries pharmaceutiques. Cela représente un challenge de taille car la glycosylation est influencée par une multitude de facteurs allant du choix de la plateforme cellulaire de production, au type de protéines recombinantes produites ainsi qu'aux conditions de culture. Parmi les facteurs affectant la production et la qualité des protéines recombinantes se trouve l'accumulation des déchets métaboliques parmi lesquels le lactate et l'ammonium sont considérés les plus nocifs. Notamment, l'accumulation de l'ammonium contribue à la dégradation de la glycosylation des protéines recombinantes. Dans cette étude, nous avons visé la réduction de l'accumulation de ces métabolites toxiques dans le but d'améliorer la production et la qualité d'une glycoprotéine thérapeutique modèle, l'interféron  $\alpha 2b$  (IFN $\alpha 2b$ ), qui est utilisée dans le traitement contre les maladies virales et les cancers.

Dans un premier temps, nous avons démontré l'effet sur la qualité de l'IFN $\alpha 2b$  d'une stratégie de génie génétique améliorant le métabolisme central du carbone et réduisant l'accumulation de lactate. En combinant plusieurs techniques complémentaires d'analyse de la glycosylation, nous avons montré que la surexpression du gène de la pyruvate carboxylase cytosolique de levure (PYC2) dans la lignée de cellulaire humaine HEK293 a un effet bénéfique sur la viabilité cellulaire, menant ainsi à un prolongement des conditions favorables pour la glycosylation et l'intégrité de l'IFN $\alpha 2b$ .

Dans un second temps, nous avons combiné la modification PYC2 à des stratégies de substitution de la glutamine dans le but de réduire l'accumulation d'ammonium. Ces expériences nous ont permis de constater l'effet bénéfique du remplacement de la glutamine par le pyruvate sur la croissance et la viabilité cellulaire ainsi que sur la production protéique. L'alimentation des cellules PYC2 en glucose et en pyruvate, combinée à l'utilisation de précurseurs de la glycosylation a permis de maximiser la production et la qualité de l'IFN $\alpha$ 2b. En outre, les cellules surexprimant la PYC2 ont démontré une croissance soutenue, une diminution significative de la production d'ammonium ainsi qu'une meilleure production d'IFN $\alpha$ 2b en condition sans glutamine. Cette dernière observation a été exploitée pour développer une stratégie de culture en mode *fed-batch*) à l'aide d'une solution nutritive concentrée ne contenant pas de glutamine. Cela a permis une réduction drastique de l'accumulation de lactate et d'ammonium, ce qui a eu pour conséquence de doubler la production en interféron  $\alpha$ 2b en culture en flacons. Des performances améliorées ont également été obtenue lors des cultures en bioréacteur conduisant ainsi, malgré l'absence de glutamine, à la production d'IFN $\alpha$ 2b hautement glycosylé.

Enfin, nous avons investigué sur le développement d'une méthode permettant de suivre la glycosylation en cours de culture. La technique de résonance plasmonique de surface associée aux lectines a été utilisée pour capturer l'IFN $\alpha$ 2b à partir du surnageant de culture afin d'analyser sa qualité. Ces travaux ont permis de mettre en évidence les défis liés à cette approche et des pistes d'amélioration ont été proposées.

Ce travail apporte une contribution notable dans l'amélioration des procédés de production de protéines thérapeutiques recombinantes. En plus de représenter une première étude sur l'influence de l'altération du métabolisme central du carbone sur la qualité des glycoprotéines recombinantes, cette étude propose des stratégies efficaces et originales pour réduire simultanément le lactate et l'ammonium, les principaux inhibiteurs des procédés de culture de cellules de mammifère. En effet, grâce à leur phénotype avantageux, l'exploitation des cellules PYC2 a permis de concilier une haute production en glycoprotéines avec une haute qualité, offrant ainsi un outil intéressant pour la production de produits médicamenteux plus efficaces et plus sûrs pour le patient.

## ABSTRACT

The production of recombinant therapeutic proteins in mammalian cell lines represents today an important part in the revenue of biopharmaceutical companies. The last 30 years have shown tremendous increase in culture yields, notably through the development of fed-batch cultures. Despite these improvements, the quality of the proteins produced tends to be low, inconsistent and prone to high variability from batch to batch.

Glycosylation is considered the most critical quality attribute because of its significant influence on the efficacy and the immunogenicity of the biotherapeutics. Especially, sialylation has a big impact on the protein half-life in the bloodstream. For these reasons, regulatory agencies like the FDA and the EMEA demand a rigorous characterization of glycoproteins quality, thereby making the control and the optimization of glycosylation a major concern for the pharmaceutical industries. This represent a serious challenge because glycosylation is influenced by several factors such as the cell line, the recombinant protein produced and the culture conditions. Among the main elements impacting protein production and quality, lactate and ammonia accumulation are considered the most detrimental. Ammonia accumulation, especially, is a well-known cause of the decrease in recombinant protein glycosylation. In this study, we focused on concomitantly reducing the accumulation of these two toxic metabolic wastes with the goal to improve the production and the quality of a model of therapeutic recombinant protein, the interferon  $\alpha 2b$  (IFN $\alpha 2b$ ). This glycosylated protein is used for the treatment of viral diseases and several cancers.

Firstly, we studied the influence of a genetic engineering modification aimed to reduce lactate accumulation and to improve the central carbon metabolism on IFN $\alpha 2b$  quality. By combining several orthogonal techniques for the analysis of glycosylation, we showed that the overexpression of the yeast pyruvate carboxylase gene (PYC2) in HEK293 cell lines improves cell culture viability which lead to sustained favorable conditions for glycosylation and IFN $\alpha 2b$  integrity.

Secondly, in order to reduce ammonia accumulation and investigate on potential synergetic effect on protein production and quality, we combined the PYC2 strategy with glutamine substitutions approaches. Theses experiments showed that replacing glutamine by pyruvate is beneficial for cell growth, culture viability and protein production. The supplementation of glucose and pyruvate in combination with glycosylation precursors allowed improving IFN $\alpha 2b$  production while sustaining high IFN $\alpha 2b$  sialylation. This part of the study also highlighted the singular

capability of PYC2 cells to grow in conditions without glutamine while demonstrating reduced ammonia accumulation and enhanced protein production. This characteristic, was then exploited for the development of a glutamine-free fed-batch culture of the PYC2 cells using a concentrated nutrient feed. In addition to reducing lactate and ammonia accumulation, this allowed 2-fold increase in IFN $\alpha$ 2b titer in shake flasks. In bioreactor, the glutamine-free fed-batch culture of PYC2 cells also led to drastic reduction in lactate and ammonia accumulation which translated into enhanced IFN $\alpha$ 2b production. These improved performances were obtained without impacting IFN $\alpha$ 2b quality as evidenced by the similar level of sialylation and glycosylation observed in conditions with and without glutamine.

Finally, we investigated on the development of a technique to monitor recombinant protein glycosylation during the culture. Surface plasmon resonance exploiting the affinity of lectins for specific glycan was used to capture the IFN $\alpha$ 2b from culture supernatant and then probe the glycans using a specific lectin. This work brought to light some of the challenges posed by this approach and several led to the proposition of several directions of improvement.

This work represents an important contribution for the development of quality-focused protein production processes. In addition to present valuable data on the influence of an altered central carbon metabolism on protein quality, this study proposes strategies to concomitantly reduce the accumulation of the two most detrimental inhibitors of mammalian cell culture performances, lactate and ammonia. Indeed, the exploitation of the advantageous phenotype of PYC2 cells allowed to reconcile protein production and quality, thereby offering an attractive and simple approach for the development of efficient cell culture processes for the mass production of high quality therapeutic glycoproteins.



## TABLE DES MATIÈRES

|  |      |
|--|------|
| DÉDICACE.....  | III  |
| REMERCIEMENTS .....  | IV   |
| RÉSUMÉ.....  | V    |
| ABSTRACT .....   | VII  |
| TABLE DES MATIÈRES .....   | IX   |
| LISTE DES TABLEAUX.....  | XIII |
| LISTE DES FIGURES.....   | XIV  |
| LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....   | XVII |
| LISTE DES ANNEXES.....   | XX   |
| CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....   | 1    |
| 1.1 Problématique.....   | 1    |
| 1.2 Objectifs .....  | 2    |
| 1.3 Organisation de la thèse .....   | 3    |
| CHAPITRE 2 REVUE DE LA LITTÉRATURE.....  | 4    |
| 2.1 La production de protéines thérapeutiques recombinantes. ....                            | 4    |
| 2.2 Le métabolisme cellulaire et la qualité des protéines.....                               | 7    |
| 2.2.1 Le métabolisme du glucose et de la glutamine. ....                                     | 7    |
| 2.2.2 L'amélioration du métabolisme du glucose par la surexpression du gène PYC2. ....       | 10   |
| 2.2.3 La glycosylation. ....   | 12   |
| 2.2.4 Le métabolisme du carbone et la voie de synthèse des hexosamines. ....                 | 18   |
| 2.3 L'importance de la glycosylation des glycoprotéines thérapeutiques.....                  | 22   |
| 2.4 L'amélioration de la production et de la qualité des glycoprotéines thérapeutiques. .... | 25   |

|            |   |    |
|------------|---|----|
| 2.4.1      | Les paramètres affectant les performances des procédés de culture. ....   | 25 |
| 2.4.2      | Les stratégies d'amélioration basées sur le génie génétique. ....   | 29 |
| 2.4.3      | Les stratégies d'amélioration basées sur la composition du milieu de culture. ....                                    | 32 |
| 2.4.4      | La glycosylation : un effet global.....   | 35 |
| 2.5        | L'évaluation et contrôle de la qualité des glycoprotéines. ....   | 36 |
| 2.5.1      | La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS).<br>38                                |    |
| 2.5.2      | Les lectines, des outils précieux pour l'étude de la glycosylation. ....  | 39 |
| 2.5.3      | La résonance plasmonique de surface. ....   | 42 |
| CHAPITRE 3 | PRÉSENTATION DU TRAVAIL ET DÉMARCHE DU PROJET. ....   | 47 |
| CHAPITRE 4 | ARTICLE 1: ALTERING THE CENTRAL CARBON METABOLISM OF<br>HEK293 CELLS: IMPACT ON RECOMBINANT GLYCOPROTEIN QUALITY..... | 49 |
| 4.1        | Présentation de l'article. ....   | 49 |
| 4.2        | Altering the central carbon metabolism of HEK293 cells: Impact on recombinant<br>glycoprotein quality.....            | 50 |
| 4.2.1      | Abstract .....  | 51 |
| 4.2.2      | Introduction .....  | 52 |
| 4.2.3      | Materials and methods .....   | 54 |
| 4.2.4      | Results .....   | 58 |
| 4.2.5      | Discussion .....  | 68 |
| 4.2.6      | Conclusion.....   | 72 |
| 4.2.7      | Acknowledgements .....  | 72 |
| 4.2.8      | References .....  | 73 |

|            |  |     |
|------------|--|-----|
| CHAPITRE 5 | ARTICLE 2: COMBINING METABOLIC AND PROCESS ENGINEERING STRATEGIES TO IMPROVE RECOMBINANT GLYCOPROTEIN PRODUCTION AND QUALITY .....                       | 79  |
| 5.1        | Présentation de l'article.....   | 79  |
| 5.2        | Combining metabolic and process engineering strategies to improve recombinant glycoprotein production and quality. ....                                  | 80  |
| 5.2.1      | Abstract .....   | 81  |
| 5.2.2      | Introduction .....   | 82  |
| 5.2.3      | Materials and methods .....  | 84  |
| 5.2.4      | Results .....  | 87  |
| 5.2.5      | Discussion .....   | 99  |
| 5.2.6      | Acknowledgements .....   | 104 |
| 5.2.7      | References .....   | 105 |
| CHAPITRE 6 | ARTICLE 3: ENHANCING GLYCOPROTEIN PRODUCTION BY THE CONCOMITANT REDUCTION OF LACTATE AND AMMONIA ACCUMULATION IN GLUTAMINE-FREE FED-BATCH CULTURES ..... | 112 |
| 6.1        | Présentation de l'article.....   | 112 |
| 6.2        | Enhancing glycoprotein production by the concomitant reduction of lactate and ammonia accumulation in glutamine-free fed-batch cultures. ....            | 113 |
| 6.2.1      | Abstract .....   | 114 |
| 6.2.2      | Introduction .....   | 115 |
| 6.2.3      | Materials and methods .....  | 116 |
| 6.2.4      | Results .....  | 119 |
| 6.2.5      | Discussion .....   | 129 |
| 6.2.6      | Acknowledgements .....   | 134 |
| 6.2.7      | References .....   | 135 |

|                 |  |     |
|-----------------|--|-----|
| CHAPITRE 7      | DISCUSSION GÉNÉRALE .....  | 142 |
| 7.1             | L'influence de la modification PYC2 sur la qualité de l'interféron $\alpha 2b$ .....                         | 142 |
| 7.2             | La combinaison du métabolisme PYC2 avec des stratégies de réduction de<br>l'accumulation de l'ammonium ..... | 144 |
| CHAPITRE 8      | CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS .....  | 147 |
| RÉFÉRENCES..... |  | 150 |
| ANNEXES .....   |  | 167 |

## LISTE DES TABLEAUX

|  |    |
|--|----|
| Tableau 2.1: Avantages et inconvénients des différentes plateformes cellulaires de production de protéines thérapeutiques recombinantes.....                         | 5  |
| Tableau 2.2: Influence de la glycosylation sur les propriétés de certaines protéines thérapeutiques recombinantes.....   | 24 |
| Tableau 2.3: Quelques exemples de l'influence des paramètres de culture sur la production et la qualité des protéines recombinantes.....                             | 28 |
| Tableau 2.4: Stratégies d'amélioration de la production et de la qualité des protéines recombinantes basées sur le génie génétique. ....                             | 31 |
| Tableau 2.5: Stratégies d'amélioration de la production et de la qualité des protéines recombinantes basées sur le choix des nutriments et des suppléments. ....     | 34 |
| Tableau 2.6 : Comparaison de plusieurs techniques d'analyse de la glycosylation.....   | 37 |
| Tableau 2.7 : Présentation de quelques lectines parmi les plus utilisées pour l'analyse des glycoprotéines. ....   | 40 |
| Table 4.1 : Metabolic rates measured in the exponential growth phase of batch cultures of HEK293-D9 (parental cells) and HEK293-F5 (PYC2-overexpressing cells). .... | 59 |

## LISTE DES FIGURES

|   |    |
|---|----|
| Figure 2.1: Évolution des approbations de biothérapeutiques produits en cellules de mammifère depuis 1989. ....   | 6  |
| Figure 2.2: Représentation schématique du métabolisme du glucose et de la glutamine. ....   | 9  |
| Figure 2.3: Modèle du métabolisme PYC2 tel que décrit par Irani et al. (1999).....  | 10 |
| Figure 2.4 : Représentation schématique du mécanisme de la N-glycosylation et de l'O-glycosylation. ....  | 14 |
| Figure 2.5: Structures de base retrouvées dans la N- et la O-glycosylation.....   | 15 |
| Figure 2.6: Représentation schématique du métabolisme central du carbone et de la voie de synthèse des hexosamines (HBP).....   | 21 |
| Figure 2.7: La résonance plasmonique de surface. ....   | 43 |
| Figure 2.8: Détection de la glycosylation des protéines par résonance plasmonique de surface en exploitant l'affinité des lectines. ....                                | 45 |
| Figure 4.1 :Viable cell density and viability profiles of PYC2-overexpressing HEK293 and the parental cells.....  | 58 |
| Figure 4.2 : Profiles of the concentrations of glucose (A), glutamine (B), lactate (C) and ammonia (D) in PYC2-overexpressing cells and parental cells cultures. ....   | 60 |
| Figure 4.3 : SDS-PAGE analysis of the supernatants from the cultures of PYC2-overexpressing cells and the parental cells.....   | 61 |
| Figure 4.4 : Western Blot analysis of the culture supernatants harvested at days 6, 7 and 8 from the cultures of PYC2-overexpressing cells and the parental cells. .... | 62 |
| Figure 4.5: Sequential glycosydase digestions of purified IFN $\alpha$ 2b from day 7 of the cultures of PYC2-overexpressing cells and the parental cells. ....          | 63 |
| Figure 4.6: Densitometry analysis of SDS-PAGE gels performed using ImageJ software. ....  | 64 |

|  |     |
|--|-----|
| Figure 4.7 : Surface plasmon resonance analysis of the sialylation of IFN $\alpha$ 2b produced by PYC2-overexpressing cells and the parental cells. ....   | 65  |
| Figure 4.8 : LC-MS analysis of the IFN $\alpha$ 2b produced by PYC2-overexpressing cells and the parental cells.....   | 67  |
| Figure 5.1 : Batch cultures of PYC2-overexpressing cells (charts on the right side) and the parental clone (charts on the left side). ....   | 89  |
| Figure 5.2 : Cell specific glucose consumption rates (qGlc), cell specific lactate production rates (qLac) and LAC/GLC ratios in batch cultures PYC2 cells and parental cells. ....  | 90  |
| Figure 5.3 : Final ammonia concentration in batch cultures of PYC2-overexpressing cells (black bars) and the parental cells (grey bars).....   | 91  |
| Figure 5.4: Final interferon $\alpha$ 2b (IFN $\alpha$ 2b) titer in batch cultures of PYC2-overexpressing cells (black bars) and the parental cells (grey bars) as assayed by surface plasmon resonance (SPR) using an immobilized Anti-IFN $\alpha$ 2b antibody. .... | 92  |
| Figure 5.5: Cultures of PYC2 cells with supplementation. Profiles of viable cell density (a) and profiles of metabolites (b). ....   | 94  |
| Figure 5.6 : Final ammonia concentration in the supplemented cultures of PYC2-overexpressing cells.....  | 95  |
| Figure 5.7: Final IFN $\alpha$ 2b titers in the cultures of PYC2-overexpressing with supplementation. Error bars depict standard deviations of the measurements. ....  | 96  |
| Figure 5.8 : Analysis of the interaction between IFN $\alpha$ 2b and SNA lectin. ....  | 98  |
| Figure 6.1 : Batch cultures of PYC2-overexpressing cells and the parental cells with and without glutamine. ....   | 120 |
| Figure 6.2: Fed-batch cultures in shake flasks with and without glutamine of PYC2-overexpressing cells and the parental cell clone.....  | 122 |
| Figure 6.3: Fed-batch cultures of PYC2 cells in bioreactor.....  | 124 |
| Figure 6.4: Quantification of final IFN $\alpha$ 2b concentration (A) and sialylation (B) in Fed-batch cultures with and without glutamine of PYC2-overexpressing cells and its parental cells. ....   | 125 |

|  |     |
|--|-----|
| Figure 6.5: LC-MS analysis of IFN $\alpha$ 2b produced by PYC2-overexpressing cells in fed-batch cultures with and without glutamine. .... | 128 |
|--|-----|



## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

|        |  |
|--------|--|
| ADCC   | Antibody Dependent Cell Mediated Cytotoxicity            |
| ARN    | Acide ribonucléique                                      |
| Asn    | Asparagine   |
| ATP    | Adénosine Triphosphate                                   |
| Bcl-xL | B-cell Lymphoma-extra large (protéine)                   |
| BHK    | Baby Hamster kidney                                      |
| CHO    | Chinese Hamster Ovary                                    |
| CMP    | Cytidine monophosphate                                   |
| EMEA   | European Agency for the Evaluation of Medicinal Products |
| EPO    | Érythropoïétine  |
| F6P    | Fructose-6-Phosphate                                     |
| FDA    | Food and Drug Administration                             |
| G6P    | Glucose-6-Phosphate                                      |
| Gal    | Galactose  |
| GalNAc | N-acétylgalactosamine                                    |
| GFA    | Glutamine:fructose-6-P aminotransferase                  |
| GlcN6P | Glucosamine-6-Phosphate                                  |
| GlcNAc | N-Acetylglucosamine                                      |
| GNE    | UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase                     |
| GPDH   | Glycérol-3-phosphate déshydrogénase                      |
| HBP    | Hexosamine Biosynthetic pathway                          |
| HEK293 | Human Embryonic Kidney                                   |

|                  |   |
|------------------|---|
| hGM-CSF          | Human Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor    |
| IFN $\alpha$     | Interféron $\alpha$                                       |
| LDH              | Lactate Dehydrogenase                                     |
| MALII            | <i>Maackia Amurensis</i> Lectin II                        |
| MSX              | L-Methionine sulfoximine                                  |
| Man              | Mannose   |
| ManNAc           | N-Acétylmannosamine                                       |
| MDH II           | Malate Dehydrogenase II                                   |
| NANA             | N-Acétylneuraminique Acide                                |
| OD               | Oxygène Dissous   |
| PAT              | Process Analytical Technology                             |
| PC               | Pyruvate Carboxylase                                      |
| pCO <sub>2</sub> | Pression partielle en dioxyde de carbone                  |
| PEP              | Phosphoénolpyruvate                                       |
| Per.C6           | Human embryonic retinoblast cells                         |
| PFK1             | Phosphofructokinase 1                                     |
| PNGase F         | Peptide:N-Glycosidase F                                   |
| pO <sub>2</sub>  | Pression partielle en oxygène dissous                     |
| PSMA             | Antigène prostatique spécifique membranaire               |
| PYC              | Pyruvate Yeast Carboxylase                                |
| SDS-PAGE         | Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis |
| Ser              | Sérine  |
| SNA              | <i>Sambucus nigra</i> Lectin                              |
| SPR              | Surface Plasmon Resonance                                 |

|     |                          |
|-----|--------------------------|
| TCA | Tricarboxylic Acid Cycle |
| Thr | Thréonine                |
| UDP | Uridine Diphosphate      |

## LISTE DES ANNEXES

|   |     |
|---|-----|
| Annexe A - Investigation de l'utilisation de la résonance plasmonique de surface associée aux lectines dans le but de développer une méthode de suivi de la glycosylation en cours de culture.<br>..... | 167 |
| Annexe B : Information supplémentaire de l'article 2 .....  | 179 |
| Annexe C : Information supplémentaire de l'article 3 .....  | 180 |

## CHAPITRE 1 INTRODUCTION

### 1.1 Problématique

Historiquement, l'optimisation des procédés de production de protéines thérapeutiques recombinantes s'est principalement focalisée sur l'augmentation des rendements en protéines. Des améliorations considérables dans les titres en protéines recombinantes ont été réalisées ces 30 dernières années, particulièrement grâce à une meilleure sélection des lignées productrices ainsi que des efforts dans la formulation des milieux nutritifs et dans le développement des stratégies de culture. Cependant, malgré les avancées majeures dans l'amélioration de la production, la qualité des protéines produites est souvent faible et inconsistante. La glycosylation est considérée comme l'attribut de qualité le plus critique pour les protéines thérapeutiques car elle affecte de manière significative leurs propriétés, leurs innocuité ainsi que l'efficacité thérapeutique. Pour cette raison, l'optimisation des attributs de qualité des protéines recombinantes est aujourd'hui un critère tout aussi crucial que l'amélioration des titres en protéines.

Actuellement, parmi les biothérapeutiques représentant les meilleures ventes, la majorité sont des protéines glycosylées (aussi appelées glycoprotéines). Les autorités régulatrices des médicaments considèrent la glycosylation comme un attribut de qualité primordial et imposent aux compagnies biopharmaceutiques la caractérisation ainsi que le maintien de cet attribut dans des limites bien définies. L'optimisation de la glycosylation représente un défi majeur pour les compagnies car cet attribut de qualité est influencé par de nombreux facteurs tels que la plateforme cellulaire de production, le type de protéine produite et les conditions opératoires de culture. De plus, les autorités régulatrices encouragent également le développement d'outils permettant le suivi et le contrôle de la qualité.

Dans ce contexte, le but principal de cette thèse est le développement de stratégies de culture permettant d'améliorer la production et la qualité d'une protéine thérapeutique modèle, l'interféron  $\alpha 2b$ , utilisée dans le traitement de nombreux cancers et de maladies virales. Cela fut réalisé en exploitant une modification génétique améliorant le métabolisme central du carbone dans la lignée cellulaire HEK293, en combinaison avec des approches de substitution des nutriments ainsi que des stratégies de culture en mode cuvée-alimentée (*fed-batch*).

## 1.2 Objectifs

Améliorer la qualité des glycoprotéines en parallèle avec l'optimisation de la production s'avère donc un défi majeur dans le développement des procédés de culture de cellules de mammifère. Dans cette thèse nous étudions l'amélioration de la qualité et de la production d'une glycoprotéine thérapeutique modèle en combinant une modification de génie génétique améliorant le métabolisme central des cellules avec des stratégies de culture en mode *fed-batch*. Cela est réalisé au travers des sous-objectifs ci-dessous :

1. L'évaluation de l'effet de la surexpression du gène PYC2 dans la lignée cellulaire humaine HEK293 sur la qualité d'une glycoprotéine thérapeutique, l'interféron  $\alpha 2b$ .
2. L'établissement d'une stratégie permettant de réduire simultanément l'accumulation d'ammonium et de lactate dans les cultures afin d'optimiser la production et la qualité de la glycoprotéine d'intérêt.
3. Le développement d'une stratégie de suivi de la glycosylation en cours de culture à l'aide de la résonance plasmonique de surface associée aux lectines.

## 1.3 Organisation de la thèse

Cette thèse comporte 8 chapitres organisés de la manière suivante. Le CHAPITRE 2 présente une revue critique de la littérature au travers de laquelle sont présentées une vue d'ensemble du domaine de la production de protéines thérapeutiques recombinantes, une description du métabolisme cellulaire et du mécanisme de la glycosylation. Ce CHAPITRE comprend aussi une discussion sur l'influence de la glycosylation sur les propriétés des biothérapeutiques ainsi qu'une discussion sur les différentes stratégies existantes pour améliorer la qualité et la production. Le CHAPITRE 3 décrit le travail et la démarche du projet de recherche. Ensuite, les chapitres 4, 5 et 6 présentent les articles publiés ou soumis dans les journaux scientifiques dans le cadre de la thèse. Dans le premier article qui étudie l'influence de la modification PYC2 sur la qualité d'une glycoprotéine thérapeutique, nous avons démontré que l'amélioration du métabolisme central du carbone causée par cette modification a un impact bénéfique sur la qualité de la glycoprotéine recombinante. En effet, cela mène à des conditions de culture plus favorables à une bonne viabilité cellulaire, ce qui retarde donc la libération de protéases et de glycosidases intracellulaires qui est généralement intensifiée en phase de mort cellulaire. Dans le deuxième article, nous avons montré que la substitution de la glutamine par le pyruvate permet de réduire simultanément les deux principaux métabolites toxiques que sont le lactate et l'ammonium tout en améliorant la production protéique. De plus, ces travaux ont démontré que les cellules surexprimant la PYC2 sont capables de croître et d'améliorer leur production en conditions sans glutamine. Cela a donné lieu à un troisième article dans lequel cette caractéristique a été exploitée. Des cultures en mode *fed-batch* sans glutamine ont été réalisées en flacon et en bioréacteur avec une amélioration significative de la production d'interféron  $\alpha 2b$  de haute qualité. Cela a représenté une observation inédite pour une lignée de cellules de mammifère non adaptée à des conditions sans glutamine et ne surexprimant pas la glutamine synthétase. Enfin, les chapitres 7 et 8 présentent la discussion générale, la conclusion et les recommandations.

## CHAPITRE 2 REVUE DE LA LITTÉRATURE

### 2.1 La production de protéines thérapeutiques recombinantes.

À l'origine, les protéines thérapeutiques comme par exemple l'insuline, l'albumine ou encore des facteurs de coagulation étaient extraits de tissus humains ou d'échantillons sanguins. Les limitations que cela impliquait en termes d'approvisionnement ainsi que le risque élevé de contamination des échantillons (par des virus ou des prions) ont motivé le développement des produits dérivés d'organismes génétiquement modifiés. En effet, la technologie de l'ADN recombinant a offert la possibilité de produire des protéines avec un profil thérapeutique mieux défini ce qui a conduit à une plus grande efficacité et à des traitements plus sûrs pour le patient.

De nos jours, à peu près 35 ans plus tard, plus de 200 biothérapeutiques ont été approuvés par les instances régulatrices en Europe et en Amérique du Nord; ce qui représente un revenu annuel d'environ 160 milliards de dollars US (Otto, Santagostino, & Schrader, 2014). Parmi la grande diversité de pathologies visées, les traitements contre les cancers, les maladies inflammatoires et les diabètes ont représenté la grande majorité des ventes en 2013 (EvaluatePharma, 2014). Les plateformes cellulaires de production utilisées regroupent les cellules bactériennes, de levure, d'insecte, de plante, de mammifère ainsi que les animaux transgéniques. Le Tableau 2.1 présente les différentes plateformes de production avec leurs avantages et leurs inconvénients. Parmi ces plateformes cellulaires, les protéines issues des cellules de mammifère représentent une part importante des revenus des industries biopharmaceutiques et le nombre d'approbation de nouveaux biothérapeutiques produits dans ces cellules connaît une constante augmentation comme illustré à la Figure 2.1. En effet, bien qu'elles soient caractérisées par une plus faible productivité par comparaison aux cellules bactériennes ou de levures, les cellules de mammifère permettent de produire des protéines plus complexes et plus compatibles avec le métabolisme humain grâce à la relative similarité au niveau des modifications post-traductionnelles et d'autres mécanismes de régulation. De plus, les rendements des cultures des cellules de mammifère ont connu une amélioration significative au cours des dernières années grâce à des stratégies basées sur une meilleure sélection des lignées productrices, une optimisation des milieux nutritionnels et un contrôle plus fin des paramètres de culture (De Jesus & Wurm, 2011).



Tableau 2.1: Avantages et inconvénients des différentes plateformes cellulaires de production de protéines thérapeutiques recombinantes.

| Plateforme cellulaire                  | Avantages  | Inconvénients  | Références  |
|--|--|--|---|
| Bactérienne                            | -Haute production en protéine<br>-Faibles coûts  | -Pas de glycosylation<br>-Sécrétion inefficace   | (Demain & Vaishnav, 2009)   |
| Levure                                 | -Haute productivité<br>-Faibles coûts<br>-Glycosylation possible                         | -Glycosylation de type "hyper mannose"<br>-Potentiellement antigénique   | (Demain & Vaishnav, 2009)   |
| Insecte                                | -Haute production en protéine<br>-Glycosylation possible<br>-Mise à l'échelle simple     | -Motif de glycosylation potentiellement immunogène   | (Demain & Vaishnav, 2009; Durocher & Butler, 2009)  |
| Plantes transgéniques                  | -Glycosylation possible<br>-Faible risque de contamination par des pathogènes            | -Pas de sialylation<br>-Résidus immunogènes (ex : $\alpha$ 1-3 fucose, $\beta$ 1,2-xylose)   | (Jin et al., 2008)  |
| Animaux transgéniques                  | -Glycosylation et sialylation possible   | -Longue durée de production requise (3,5 à 32 mois)<br>-Coûts élevés<br>-Purification complexe<br>-Immunogénicité                                  | (Goergen, Guedon, & Clincke, 2011)  |
| Lignées murines (CHO, BHK, ...)        | -Glycosylation modérément similaire à celle de l'Homme                                   | -Faible productivité comparée aux lignées bactériennes<br>-Motifs de glycosylation non-humains<br>-Immunogénicité: type de sialylation non-humaine | (Brooks, 2004; Padler-Karavani et al., 2008; Xu, Xun et al., 2011)                                |
| Lignées humaines (HEK293, Per.C6, ...) | -Glycosylation et sialylation de type humain.<br>-Moindre risque de réaction immunitaire | -Faible productivité en comparaison aux lignées bactériennes<br>-Risque potentiel de contamination par des virus nocifs pour l'Homme               | (Fliedl, Grillari, & Grillari-Voglauer, 2015)<br>(Dumont, Euwart, Mei, Estes, & Kshirsagar, 2016) |

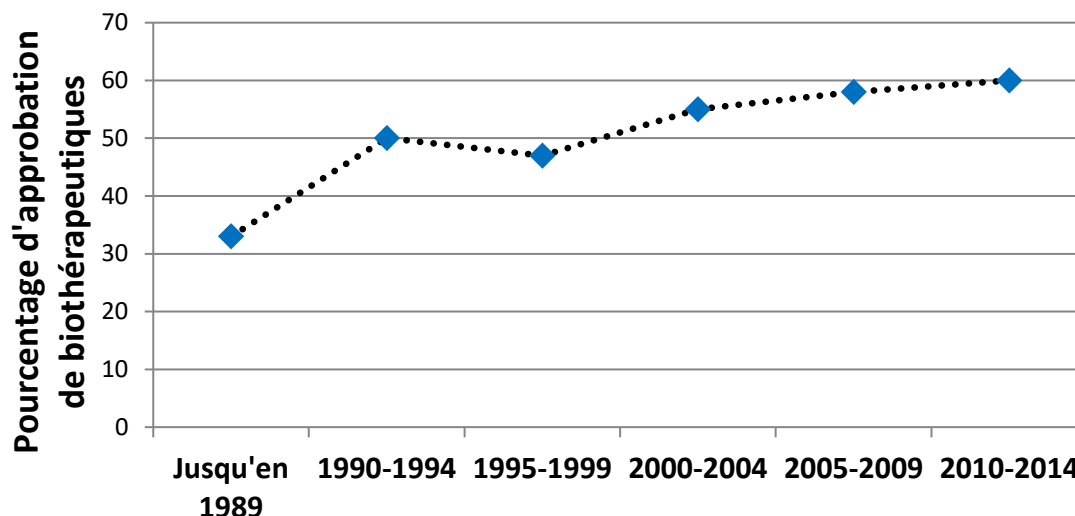


Figure 2.1: Évolution des approbations de biothérapeutiques produits en cellules de mammifère depuis 1989. Les données sont exprimées en pourcentage du nombre total d'approbations de biothérapeutiques pour la période concernée. Adapté de Walsh (2014).

Le système d'expression mammalien le plus utilisé aujourd'hui est la cellule de hamster chinois (aussi appelée cellule CHO). Par exemple, celle-ci fut la plateforme de production de 33% des nouveaux biothérapeutiques approuvés entre l'année 2010 et 2014 (Walsh, 2014). Cependant, un nombre plus faible de produits, principalement des protéines nécessitant des modifications post-traductionnelles particulières, sont produites dans des lignées cellulaires humaines (Dumont et al., 2016). En effet, malgré une relative similarité avec l'homme au niveau des modifications post-traductionnelles, les protéines issues des cellules CHO peuvent présenter des résidus potentiellement immunogènes ce qui représente un danger pour la sécurité du patient (Ghaderi, Taylor, Padler-Karavani, Diaz, & Varki, 2010). En revanche, les cellules humaines présentent plus de chances de produire des protéines arborant un profil de modifications post-traductionnelles encore plus proche de celui retrouvé chez l'homme, assurant ainsi l'efficacité et la sécurité du traitement. Pour ces raisons, on observe depuis récemment un intérêt grandissant pour l'utilisation de lignées cellulaires humaines pour la production de glycoprotéines thérapeutiques recombinantes (Dumont et al., 2016; Fliedl et al., 2015).

Du fait de l'influence importante de la qualité des protéines recombinantes sur leur efficacité thérapeutique et leur immunogénicité, les instances régulatrices encouragent les industries biopharmaceutiques à effectuer une caractérisation rigoureuse de protéines ainsi qu'à mettre en

place des outils permettant le contrôle de leur qualité (EMA, 1999; FDA, 1996). La glycosylation est une modification post-traductionnelle considérée comme l'attribut de qualité le plus critique car celle-ci a un impact majeur sur les propriétés du biothérapeutique (Butler, Michael & Spearman, 2014). En plus d'être dépendante du type de protéine et de la lignée cellulaire de production, elle est fortement influencée par les conditions de culture. D'autre part, l'analyse précise de cet attribut de qualité implique généralement des méthodes relativement longues et fastidieuses, ce qui rend difficile l'implémentation d'un système de suivi et de contrôle de la glycosylation en cours de culture.

En définitive, répondre à la demande mondiale croissante en biothérapeutiques, tout en assurant la haute qualité de ceux-ci représente un challenge majeur pour les industries biopharmaceutiques. Cela implique le développement de stratégies d'amélioration des rendements de production tout en veillant à ce que cela ne se fasse pas au détriment de la qualité. De plus, avec les nombreux brevets arrivant à expiration, les industries sont confrontées à l'avènement des biosimilaires. Ces biothérapeutiques, conçus pour être hautement similaires au biothérapeutique d'origine (aussi appelé *originator*, le premier approuvé), viennent concurrencer celui-ci sur le marché. Cependant, malgré une procédure d'approbation relativement moins lourde que pour l'*originator*, concevoir un biosimilaire est un processus hautement complexe qui requiert également une profonde compréhension des paramètres affectant la qualité de la protéine recombinante.

Dans ce contexte, la compréhension du fonctionnement du métabolisme cellulaire et plus particulièrement son interaction avec le mécanisme de la glycosylation revêt une importance primordiale pour l'élaboration de stratégies permettant d'améliorer la production et la qualité des protéines thérapeutiques.

## **2.2 Le métabolisme cellulaire et la qualité des protéines.**

### **2.2.1 Le métabolisme du glucose et de la glutamine.**

Le glucose et la glutamine sont les principaux nutriments utilisés par les cellules de mammifère.

L'assimilation du glucose se fait essentiellement par diffusion facilitée. Cette assimilation est stimulée par de hautes concentrations dans le milieu. Au travers de la glycolyse, une molécule de glucose est convertie en deux molécules de pyruvate (voir Figure 2.2 page 9). La majeure partie du pyruvate est convertie en lactate tandis qu'une plus faible proportion entre dans le cycle des acides tricarboxyliques (TCA). La production de lactate est considérée comme une métabolisation inefficace du glucose car celle-ci conduit à une plus faible production d'énergie, c'est-à-dire 2 moles d'ATP générées par mole de glucose consommée par comparaison à la voie TCA qui générerait 36 moles d'ATP par mole de glucose consommée si on ne considérait pas la conversion en lactate. La conversion du pyruvate en lactate est catalysée par l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) tandis que la conversion du pyruvate en acétyl-coenzyme A est réalisée par l'enzyme pyruvate déshydrogénase (voir Figure 2.2 page 9). L'acétyl-coenzyme A peut ensuite être utilisée dans le cycle TCA. Le pyruvate peut aussi être converti en oxaloacétate grâce à l'action de l'enzyme pyruvate carboxylase (PC) présente dans la mitochondrie. Comme cela sera discuté dans les sections suivantes, ces activités enzymatiques peuvent être la cible de stratégies de génie génétique visant à altérer l'utilisation du glucose vers un métabolisme plus efficient dans les plateformes cellulaires de production.

À l'instar du glucose, l'assimilation de la glutamine est elle aussi stimulée par de hautes concentrations dans le milieu de culture. La glutamine est une source majeure d'azote et est impliquée dans de nombreuses voies de biosynthèse. La glutamine assure également le flux de carbone vers le TCA pour la production d'énergie. La déamination de la glutamine produit du glutamate et de l'ammonium. Par une réaction de transamination avec le pyruvate, le glutamate peut être converti en un intermédiaire du TCA, l' $\alpha$ -cétoglutarate. Cette réaction produit également de l'ammonium. Dans une moindre mesure, l'ammonium peut aussi être générée par la dégradation spontanée de la glutamine dans le milieu selon une réaction dépendante de la température. Le métabolisme du glucose et de la glutamine sont intimement reliés (Zhou, W., Rehm, Europa, & Hu, 1997). Ils sont partiellement complémentaires et peuvent être partiellement substituables en tant que source de carbone pour la biosynthèse et pour la production d'énergie.

Le lactate et l'ammonium sont les principaux déchets du métabolisme du glucose et de la glutamine dans les cultures de cellules de mammifère. Dans les lignées cellulaires immortalisées, on estime que la majeure partie du glucose consommé est oxydé en lactate (Neermann & Wagner, 1996; Xie & Zhou, 2005). L'accumulation du lactate lors des cultures mène à une acidification du

milieu, ce qui impose d'ajouter une relativement grande quantité de solution basique pour maintenir le pH à des valeurs optimales pour le maintien et la croissance des cellules. Cela a pour conséquence une augmentation de l'osmolalité du milieu ce qui a un effet inhibiteur sur la croissance et la productivité des cellules de mammifère. En outre, l'ion lactate en lui-même est un inhibiteur de la croissance et de la productivité (Cruz, H., Freitas, C., Alves, P., Moreira, J., & Carrondo, M., 2000; Lao & Toth, 1997). L'ion ammonium est également néfaste pour le rendement des cultures, puisqu'il contribue à l'acidification du cytoplasme provoquant une altération des activités enzymatiques et par conséquent une croissance cellulaire inhibée. On soupçonne également l'ammonium de jouer un rôle dans l'induction de l'apoptose (Mercille & Massie, 1994). Enfin, l'ammonium est aussi reconnue pour influencer les attributs de qualité de la protéine recombinante en altérant le fonctionnement de certaines enzymes impliquées dans les modifications post-traductionnelles (Gawlitsek, Ryll, Lofgren, & Sliwowski, 2000). Les concentrations limites acceptables dans le milieu lors des cultures de cellules de mammifère sont d'environ 20 mM pour le lactate et de 3 mM pour l'ammonium (Cruz, H. et al., 2000; Nadeau et al., 1996).

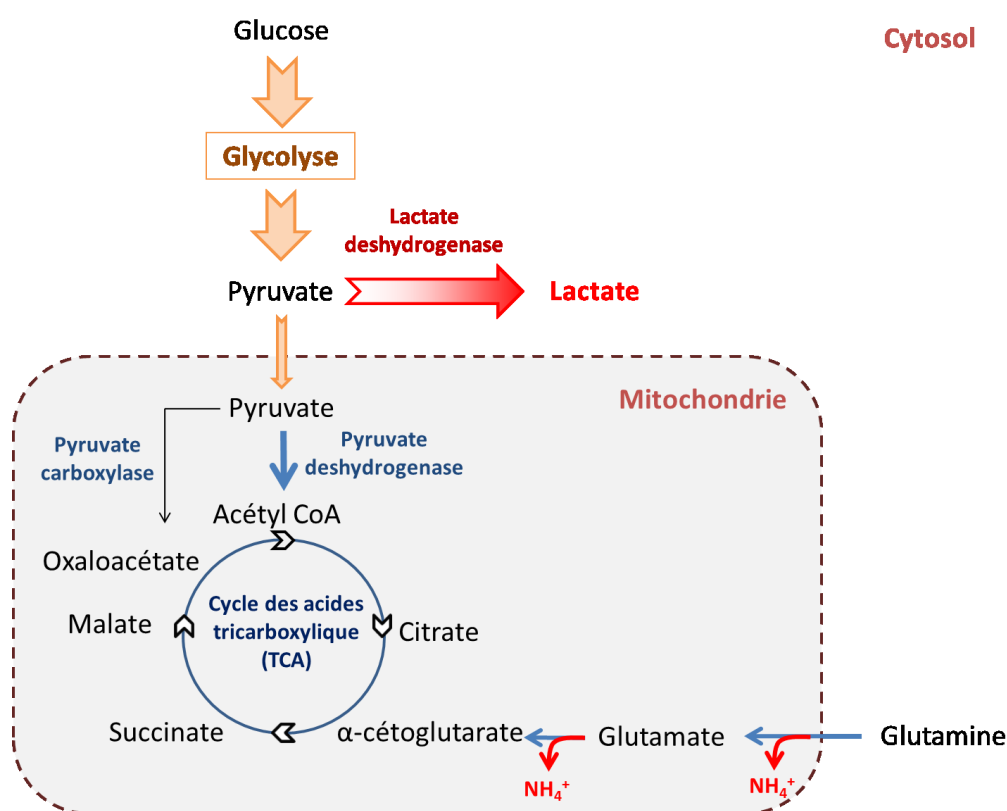


Figure 2.2: Représentation schématique du métabolisme du glucose et de la glutamine.

## 2.2.2 L'amélioration du métabolisme du glucose par la surexpression du gène PYC2.

La surexpression de l'enzyme pyruvate carboxylase cytosolique de la levure (PYC2) dans les lignées de production est une stratégie de génie génétique qui améliore significativement l'utilisation du glucose dans les cellules de mammifère (Elias et al., 2003; Fogolin, Wagner, Etcheverrigaray, & Kratje, 2004; Henry & Durocher, 2011; Irani, Noushin, Wirth, Manfred, van den Heuvel, Joop, & Wagner, Roland, 1999; Vallée, Durocher, & Henry, 2014). Selon le modèle d'Irani et de ses collaborateurs (voir Figure 2.3), l'enzyme PYC2 permet de convertir, dans le cytosol, le pyruvate issu de la glycolyse en oxaloacétate réduisant ainsi sa disponibilité pour la conversion vers le lactate. L'oxaloacétate peut par la suite être réduit en malate par la malate déshydrogénase cytosolique. Ce dernier peut alors franchir les membranes mitochondriales et être utilisé dans le TCA (Irani, Noushin et al., 1999).

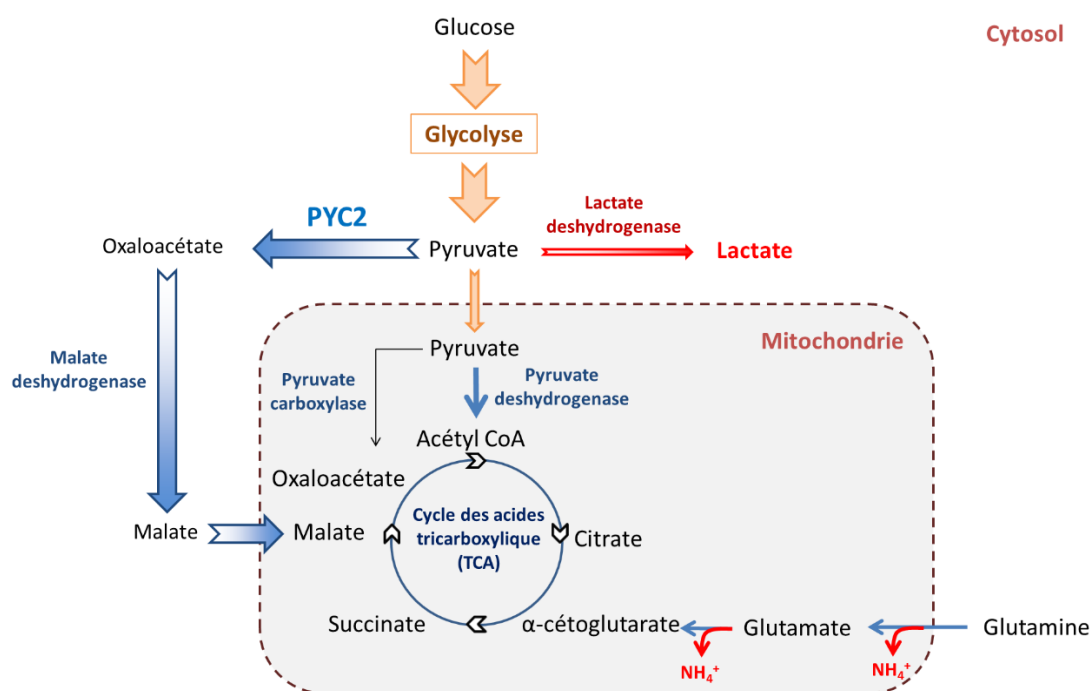


Figure 2.3: Modèle du métabolisme PYC2 tel que décrit par Irani et al. (1999)

Le gène de la pyruvate carboxylase a été introduit pour la première fois dans une lignée de cellules de mammifère par Irani et al. (1999). Dans leur étude, les auteurs ont transfecté une lignée cellulaire BHK avec le gène de la pyruvate carboxylase cytosolique de la levure *Sacharomyces cerevisiae* (PYC2) (Irani, Noushin et al., 1999). En mode de culture cuvée (*batch*), par comparaison

avec la lignée parentale, les cellules transformées ont présenté une diminution du taux de consommation spécifique en glucose et du taux de production spécifique en lactate d'un facteur 4 et 2,5 respectivement. L'étude à l'aide de glucose marqué par des isotopes radioactifs a permis de constater un flux plus grand du glucose vers le TCA dans les cellules transformées (Irani, Noushin et al., 1999).

Cette stratégie a été adaptée à d'autres lignées de cellules de mammifère. Par exemple, Fogolin et ses collaborateurs (2003) ont étudié l'effet de l'expression de la pyruvate carboxylase dans des cellules CHO en mode de culture *batch*. Malgré un taux de croissance plus faible et une concentration maximale en cellules plus basse, les cultures de cellules exprimant la PYC2 ont maintenu une viabilité supérieure à 80% plus longtemps, ce qui a permis d'atteindre une concentration maximale en protéine recombinante plus élevée par rapport à la lignée non modifiée. Cependant, aucun effet significatif sur la consommation de glucose et de glutamine n'a été observé (Fogolin et al., 2004). Sung Hyun Kim et al. (2007) ont transfecté des cellules CHO avec le gène de la pyruvate carboxylase humaine. Toutefois, comme cette enzyme est localisée dans la mitochondrie, les auteurs ont observé un effet beaucoup plus modeste sur la consommation de glucose et dans la production de lactate (Kim, S. H. & Lee, 2007b). La surexpression de la PYC2 dans les cellules HEK293 a aussi démontré une réduction dans la consommation de glucose et de glutamine associée à une réduction dans le taux de production de lactate et d'ammonium d'un facteur 4 et 3 respectivement (Elias et al., 2003). Cédric Vallée et al. (2014) ont également montré que le mode de culture *fed-batch* permet d'exploiter les avantages que confère la modification PYC2 de cellules HEK293 produisant l'interféron  $\alpha 2b$ . Les auteurs ont pour cela utilisé une stratégie d'alimentation dynamique qui consiste en une boucle de contrôle basée sur la mesure « *at-line* » de la concentration en glucose. En mode de culture *batch* en bioréacteur, les améliorations observées dans la croissance et dans le métabolisme du glucose et de la glutamine (réduction de la production de lactate et d'ammonium) ne se sont pas traduites par une plus grande production volumétrique en comparaison avec la lignée parentale. Par contre, les cultures en mode *fed-batch* ont démontré une augmentation du titre maximal en interféron  $\alpha 2b$  (par comparaison avec la culture en mode *batch* de la lignée parentale) d'un facteur 1.6. Cependant, comme le taux spécifique de production est resté inchangé, cela suggère que la grande concentration en interféron obtenue fut principalement due à une meilleure croissance cellulaire (Vallée et al., 2014).

### 2.2.3 La glycosylation.

L'avantage des cellules de mammifère par rapport aux autres plateformes cellulaires pour la production de protéines recombinantes réside dans leur capacité à produire des protéines possédant des modifications post-traductionnelles se rapprochant le plus de celles retrouvées chez l'humain (Zhu, J., 2012). Les modifications post-traductionnelles des protéines désignent les différentes réactions de modifications que celles-ci peuvent subir après la traduction de leur ARN messager en une chaîne d'acides aminés. Ces modifications influencent grandement la structure, la bioactivité de la protéine, sa stabilité *in vivo* et son immunogénicité (Narhi et al., 1991; Sinclair & Elliott, 2005). Parmi ces modifications post-traductionnelles, la glycosylation est considérée la plus critique car elle a une influence majeure sur les fonctions biologiques des protéines (Raman, Raguram, Venkataraman, Paulson, & Sasisekharan, 2005). Les protéines glycosylées sont appelées glycoprotéines et chez l'Homme, on estime que la glycosylation concerne environ 50% des protéines produites (Wong, C.-H., 2005). Par ailleurs, la glycosylation est un processus qui est fortement dépendant du type cellulaire, de son état physiologique, du type de protéine mais aussi des conditions de culture (Croset et al., 2012; Hossler, Khattak, & Li, 2009; Werner, Kopp, & Schlüter, 2007).

La glycosylation consiste en l'ajout de groupements monosaccharidiques (les glycans) de manière covalente sur la chaîne polypeptidique (voir la Figure 2.4 page 14). On distingue la N- et la O-glycosylation. La N-glycosylation débute dans le réticulum endoplasmique et se poursuit dans l'appareil de Golgi (Seth, Hossler, Yee, & Hu, 2006). Contrairement à l'O-glycosylation dans laquelle la structure glycan est construite pas à pas, dans la N-glycosylation, une structure glycan pré-synthétisée est arrimée directement à la chaîne polypeptidique par liaison covalente entre un résidu N-acétylglucosamine (GlcNAc) de cette structure et l'azote de la fonction amide d'un résidu asparagine (Asn) de la glycoprotéine en voie de synthèse (voir la Figure 2.4). Cette structure est par la suite modifiée par des étapes successives d'ajouts et de retraits de monosaccharides. Ce type de glycosylation se produit le plus généralement dans des séquences d'acides aminés particulières appelées séquences consensus. Il s'agit des séquences du type Asn-Xaa-Ser/Thr, avec Xaa correspondant à n'importe quel acide aminé excepté la proline (Marino, Bones, Kattla, & Rudd, 2010). Les séquences consensus des protéines ne sont pas toujours glycosylées; cette séquence est donc une condition nécessaire mais pas suffisante pour l'avènement de la glycosylation. L'O-glycosylation peut commencer aussi bien dans le réticulum endoplasmique que dans l'appareil de



Golgi par l'ajout de manière covalente d'un monosaccharide, généralement le N-acétylgalactosamine (GalNAc) sur l'oxygène du groupement hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine de la protéine. C'est une enzyme du type glycosyltransférase (la N-acétylgalactosaminyltransférase) qui catalyse le transfert du GalNAc de l'uridine diphosphate N-acétylgalactosamine (UDP-GalNAc), un nucléotide-ose, à la chaîne latérale de la glycoprotéine. La structure glycane est par la suite construite par ajouts successifs de monosaccharides. Il s'agit généralement de galactoses à partir d'UDP-Gal, de N-acétylgalactosamines (à partir d'UDP-GalNAc), de N-acetylglucosamines (à partir d'UDP-GlcNAc) ou d'acides sialiques (à partir de CMP-sial) pour la sialylation (Marino et al., 2010) (voir la Figure 2.4). Bien qu'à ce jour, aucune séquence consensus n'ait été associée à l'O-glycosylation, son occurrence a été corrélée avec une forte présence de résidus proline, alanine et glycine autour du site de glycosylation et de structures secondaires de type feuillet  $\beta$  (Hansen, J. E., Lund, Engelbrecht, Bohr, & Nielsen, 1995). Contrairement aux N-glycans qui sont tous caractérisés par une structure basale (aussi appelée noyau) pentasaccharidique (du type Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>), les structures d'O-glycans ont été associées à au moins 8 structures basales différentes (Hossler et al., 2009). La Figure 2.5 à la page 15 représente les différents noyaux retrouvés dans les structures d'N- et d'O-glycans.

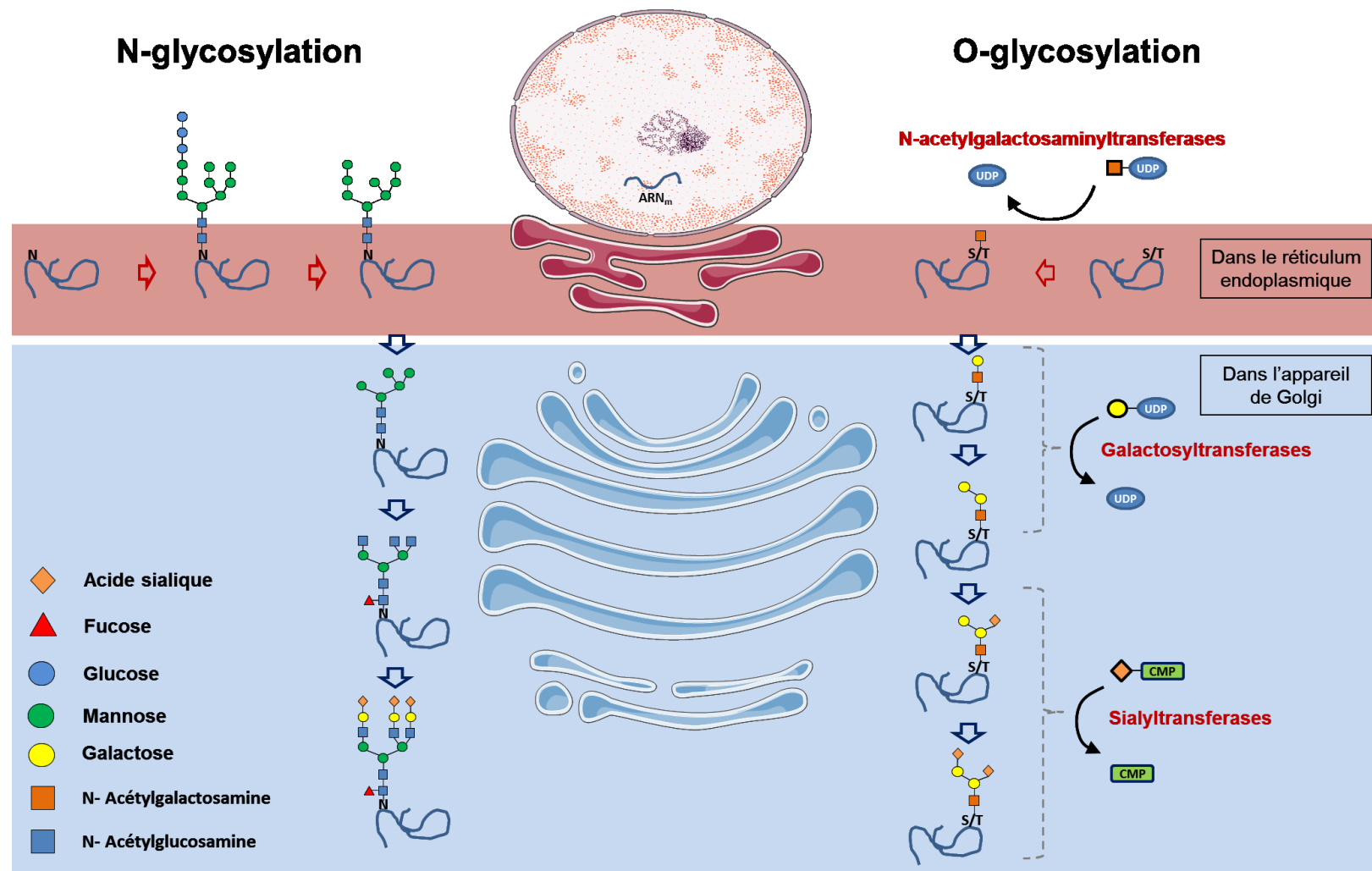


Figure 2.4 : Représentation schématique du mécanisme de la N-glycosylation et de l'O-glycosylation. Figure inspirée de Andersen et al. (1994), de Hossler et al. (2009) et de Werner et al. (2007).

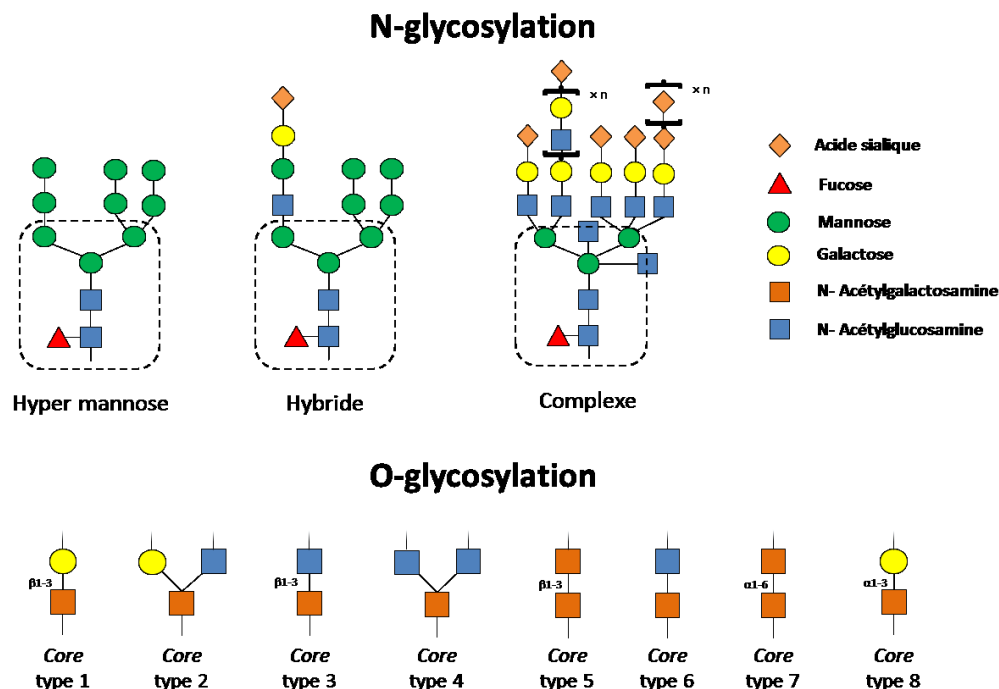


Figure 2.5: Structures de base retrouvées dans la N- et la O-glycosylation. Adapté de Hossler et al. (2009) et de Tailford et al. (2015).

Dans les procédés de culture de cellules de mammifère, les protéines recombinantes produites présentent généralement une grande hétérogénéité dans leur profil de glycosylation (Butler, M., 2006). La glycoprotéine d'intérêt est alors présente sous diverses glycoformes, c'est-à-dire diverses versions de la glycoprotéine qui se distinguent seulement par leur profil de glycosylation. On parle de macrohétérogénéité lorsque les glycoformes diffèrent au niveau du site de la glycosylation (les sites sont glycosylés ou non) et de microhétérogénéité lorsque la différence se situe dans le type de monosaccharides présents sur un site de glycosylation donné (Solá & Griebenow, 2010). Les glycoprotéines peuvent aussi se distinguer par le type de liaison entre les différents glycans composant leur structure glycane, ce qui offre un degré de liberté supplémentaire à la diversité structurale de ces protéines.

Parmi les différences qu'on peut observer en termes de microhétérogénéité, la sialylation est l'une des plus étudiées. La sialylation consiste en l'ajout d'un acide sialique à un résidu galactose, à un résidu N-acétylgalactosamine (GalNAc) ou à un autre acide sialique situé en bout d'une antenne de la structure d'O-glycans ou de N-glycans de la glycoprotéine. Les acides sialiques représentent une large famille de sucres aminés et sont retrouvés principalement dans les

glycoprotéines et les glycolipides des organismes vertébrés et chez certaines bactéries (Chen, X. & Varki, 2010). Ils jouent un rôle crucial dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, tels que l'embryogénèse du système nerveux, la métastase cancéreuse, la régulation immunologique ou l'infection bactérienne et virale (Angata & Varki, 2002; Chen, X. & Varki, 2010). Bien que la plupart des mammifères expriment l'acide sialique N-glycolylneuraminique (NGNA), celui-ci n'est pas retrouvé chez l'homme. Les cellules humaines expriment principalement l'acide N-acétylneuraminique (NANA). Les lignées cellulaires CHO et BHK qui sont utilisées pour la production de protéines thérapeutiques recombinantes peuvent intégrer les deux types d'acide sialique dans leurs glycoprotéines. Cela conduit à une problématique importante car il a été démontré que la présence de NGNA dans les glycoprotéines est immunogène pour l'homme (Ghaderi et al., 2010; Noguchi, Mukuria, Suzuki, & Naiki, 1995).

Le mécanisme de la sialylation implique la liaison d'un groupe acide sialique activé (acide N-acétylneuraminique cytidine monophosphate : CMP-NANA) au résidu galactose, N-acétylgalactosamine (GalNAc) ou à un autre acide sialique de la structure de glycans. Cette réaction est catalysée par les enzymes sialyltransférases dans la région du trans-golgi (voir Figure 2.4, page 14). Il existe différentes sialyltransférases et deux d'entre elles sont importantes pour les glycoprotéines humaines. L'enzyme  $\alpha$ -2,3-sialyltransférase permet le transfert de l'acide sialique en position C-3 du résidu galactose terminal et l'enzyme  $\alpha$ -2,6-sialyltransférase transfère l'acide sialique en position C-6 du galactose terminal (Li, Y. & Chen, 2012). Cette dernière enzyme est absente dans les lignées cellulaires CHO et BHK et par conséquent, seul l'acide sialique terminal lié en  $\alpha$ 2,3 est retrouvé dans les glycoprotéines produites par ces cellules (Xu, Xun et al., 2011). Par contre, les lignées humaines expriment les deux types de sialyltransférases (Wang, Z., Hilder, van der Drift, Sloan, & Wee, 2013). Bien qu'aucun effet immunogénique de la glycoprotéine dû à une différence dans le type de liaison de l'acide sialique n'ait encore été observé, une étude dans laquelle des cellules CHO modifiées génétiquement pour exprimer l'enzyme  $\alpha$ -2,6-sialyltransférase et produisant de l'interféron  $\gamma$  a démontré que la glycoprotéine issue de la lignée modifiée possède de meilleures propriétés pharmacocinétiques par comparaison à celles de la lignée parentale exprimant donc uniquement l'enzyme  $\alpha$ -2,3-sialyltransférase (Bragonzi et al., 2000). De plus, il a été démontré récemment que les immunoglobulines de type G sialylées en  $\alpha$ 2,6 conduisent à une amélioration de l'activité de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (aussi appelé ADCC) (Lin et al., 2015). Dans le but de produire des protéines ayant ce

type de profil de sialylation, plusieurs études ont envisagé la surexpression de l'enzyme  $\alpha 2,6$  sialyltransférase dans les cellules CHO. Cela a conduit, à des degrés divers, à l'amélioration de la sialylation de manière générale en plus de la proportion de protéines sialylées en liaison  $\alpha 2,6$  (Minch, Kallio, & Bailey, 1995; Onitsuka, Kim, Ozaki, Kawaguchi, Honda, Kajiura, Fujiyama, Asano, Kumagai, & Ohtake, 2012; Yin et al., 2015). En définitive, le profil de glycosylation recherché peut s'avérer un critère important à considérer dans le choix de la lignée de cellules de mammifère pour la production d'une glycoprotéine à but thérapeutique.

## 2.2.4 Le métabolisme du carbone et la voie de synthèse des hexosamines.

Le métabolisme central du carbone et le mécanisme de glycosylation sont étroitement liés. Traditionnellement, de nombreuses stratégies d'optimisation des rendements de culture ont visé l'amélioration du métabolisme nutritionnel des cellules et la réduction de l'accumulation des métabolites toxiques pour ainsi favoriser la production protéique. Cependant, cela ne s'est pas toujours fait en parallèle avec l'évaluation de l'impact de ces stratégies sur la qualité des protéines. Aujourd'hui, l'amélioration de la qualité est considérée aussi primordiale que l'augmentation des titres en protéines. Ainsi, l'optimisation des procédés de culture nécessite une compréhension poussée des interactions entre le métabolisme énergétique cellulaire et le mécanisme de la glycosylation. A cet égard, de nombreuses études dans le domaine de la cancérologie ont apporté une contribution notable.

La voie de biosynthèse des hexosamines (HBP) génère les molécules précurseurs de la glycosylation. La Figure 2.6 à la page 21 représente schématiquement le métabolisme central du carbone et la voie de synthèse des hexosamines ainsi que leurs connections majeures. Une connexion importante entre le métabolisme central du carbone et la HBP se fait au niveau de la glycolyse. En effet, lorsque le glucose pénètre la cellule, il est phosphorylé en glucose-6-phosphate (G6P) puis converti en fructose-6-phosphate (F6P). La majeure partie ( $\geq 95\%$ ) du F6P continue dans la glycolyse tandis qu'une fraction est dirigée vers la HBP dont la première étape consiste en une réaction cinétiquement limitante catalysée par l'enzyme glutamine:fructose-6-P aminotransferase (GFA) avec l'aide de la glutamine pour générer le glucoseamine-6-P (GlcN6P) (voir Figure 2.6 page 21). Cette première réaction du HBP, qui a lieu dans le cytosol, illustre l'importance de la disponibilité du glucose et de la glutamine dans le mécanisme de la glycosylation. En effet, comme cela sera discuté au point 2.4.3 (page 32), les stratégies de culture basées sur le maintien du glucose et/ou de la glutamine en faible concentration peuvent avoir une incidence notable sur la glycosylation des protéines recombinantes.

Les étapes réactionnelles qui suivent se produisent également dans le cytosol et mènent à la formation de l'uridine diphosphate N-Acetylglucosamine (UDP-GlcNAc), un nucléotide-ose essentiel à l'O- et la N-glycosylation (voir Figure 2.6 page 21). Celui-ci est impliqué en tant que substrat dans de nombreuses réactions de synthèse des glycans. Notamment, l'UDP-GlcNAc peut être converti en d'autres nucléotides-oses tels que l'UDP-GalNAc mais également en N-

Acétylmannosamine (ManNAc). Cette dernière réaction générant ManNAc est une étape importante dans la synthèse de l'acide sialique et représente un point majeur de régulation de la sialylation (Hinderlich, Weidemann, Yardeni, Horstkorte, & Huizing, 2013). La synthèse de l'acide sialique commence donc par la conversion de l'UDP-GlcNAc en ManNAc catalysée par l'enzyme bifonctionnelle UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase (GNE). Les étapes suivantes mènent à la génération de l'acide sialique (NANA dans la Figure 2.6) et requièrent l'utilisation du phosphoenolpyruvate (PEP), une autre molécule issue de la glycolyse. Lors de la dernière étape, l'acide sialique est transporté dans le noyau cellulaire pour sa conversion en sa forme activée, c'est-à-dire l'acide N-Acétylneuraminique cytidine monophosphate (CMP-NANA). Le niveau de CMP-NANA régule la synthèse de ManNAc par retro-inhibition sur l'enzyme GNE. Ce mécanisme explique pourquoi la surexpression de GNE dans les cellules ne mène pas nécessairement à une augmentation de la synthèse d'acide sialique (Kontou, Weidemann, Bauer, Reutter, & Horstkorte, 2008). Cependant, en combinant cette stratégie avec une mutation de GNE pour supprimer le site de retro-inhibition, on peut observer une augmentation significative de la sialylation des protéines recombinantes (Bork, Reutter, Weidemann, & Horstkorte, 2007; Son, Jeong, Park, & Kim, 2011). Chez l'Homme, une autre mutation de GNE est responsable d'une maladie très invalidante caractérisée par une faiblesse musculaire appelée la myopathie GNE. Des études récentes ont démontré que le sérum sanguin et les muscles des personnes atteintes de cette maladie contiennent une quantité très diminuée d'acide sialique (Chan et al., 2017). L'administration orale de ManNAc aux patients atteints de la myopathie GNE pour combattre l'hyposialylation des glycoprotéines musculaires vient d'être testée cliniquement pour la première fois et a démontré que cela permet la restauration de la synthèse de l'acide sialique (Xu, Xin et al., 2017).

Il a été avancé que le métabolisme du glucose et celui de la glutamine pourraient coopérer pour limiter le flux de glucose et de glutamine vers la voie de synthèse des hexosamines dans le but de limiter la glycosylation des protéines et ainsi moduler le phénotype cellulaire. En effet, Lindsey Araujo et ses collaborateurs (2016) ont démontré que le passage chez les lymphocytes T d'un métabolisme principalement oxydatif vers un métabolisme avec une plus grande consommation de glucose (et par conséquent une grande production de lactate) et de glutamine, diminue le flux de ces molécules vers la voie HBP, ce qui influence le degré de glycosylation des protéines et de ce fait la croissance et la différenciation cellulaire (Araujo, Khim, Mkhikian, Mortales, & Demetriou, 2017).

Un autre lien important entre le métabolisme du glucose et de la glutamine et la voie de synthèse des hexosamines (HBP) a été mis en évidence dans l'étude de Wellen et al. (2010). Dans plusieurs lignées de cellules de mammifère, le manque de glucose provoque l'arrêt de l'assimilation de la glutamine ainsi que le déclin de voies métaboliques clés (ex : la glycolyse, le cycle de Krebs) dont la HBP. Les auteurs ont démontré que la disponibilité du glucose régule l'expression d'un récepteur à un facteur de croissance (IL-3) qui stimule la consommation de glutamine, la croissance et la prolifération cellulaire. En absence de glucose, la HBP est à l'arrêt et le récepteur n'est pas exprimé ce qui arrête l'assimilation de la glutamine. Cependant, l'ajout de GlcNAc pour restaurer la HBP rétablit l'action d'IL-3 sur son récepteur ainsi que la consommation de glutamine en absence de glucose, ce qui permet d'alimenter le cycle de Krebs et de promouvoir la prolifération cellulaire. Il s'est avéré que le récepteur d'IL-3 est une glycoprotéine dont la glycosylation est nécessaire pour la régulation de son expression à la surface des cellules (Wellen et al., 2010).

Enfin, la glycosylation peut également influencer certaines enzymes impliquées dans le métabolisme central du carbone. C'est le cas par exemple de l'enzyme phosphofructokinase 1 (PFK1) qui est un important régulateur de la glycolyse. Il a été démontré que la glycosylation de PFK1 influence grandement son activité et donc l'utilisation du glucose permettant ainsi de moduler le métabolisme cellulaire (Yi et al., 2012).



Figure 2.6: Représentation schématique du métabolisme central du carbone et de la voie de synthèse des hexosamines (HBP).

## 2.3 L'importance de la glycosylation des glycoprotéines thérapeutiques.

Il existe actuellement, sur le marché, un grand nombre de glycoprotéines thérapeutiques dont la stabilité, l'immunogénicité et la bioactivité sont fortement influencées par la glycosylation (Gornik & Lauc, 2008; Sinclair & Elliott, 2005; Solá & Griebenow, 2010). Le Tableau 2.2 (page 24) présente des exemples de glycoprotéines thérapeutiques dont la glycosylation a été reconnue comme ayant une influence importante sur leurs propriétés. Nous pouvons voir que la glycosylation influence la stabilité de nombreuses glycoprotéines thérapeutiques. Les glycans présents sur les glycoprotéines jouent un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la molécule et dans la résistance à la dénaturation physicochimique (Sinclair & Elliott, 2005). Par exemple, l'interféron  $\beta$  glycosylé a démontré une meilleure résistance à la dénaturation thermique et une moindre tendance à l'agrégation par comparaison à la même protéine non glycosylée (Runkel et al., 1998). L'érythropoïétine humaine recombinante, sous forme non glycosylée, est plus facilement dénaturée par une augmentation de la température et une diminution du pH (Narhi et al., 1991). Il a été proposé que l'amélioration de la résistance thermique des protéines glycosylées soit due à une stabilisation de l'état natif de la glycoprotéine par la présence des glycans (Kwon & Yu, 1997). La présence des glycans préviendrait d'autre part l'agrégation en augmentant les répulsions stériques entre les protéines (Solá & Griebenow, 2009). De plus, en réduisant la propension à l'agrégation, la glycosylation a également un effet sur l'immunogénicité des glycoprotéines. En effet, la présence d'agrégats protéiques est susceptible de provoquer une réponse immunitaire comme cela a été démontré dans l'étude de Braun et al. (1997) dans laquelle l'immunogénicité de l'interféron  $\alpha$  sous forme agrégé a été étudiée chez la souris (Braun, Kwee, Labow, & Alsenz, 1997). Enfin, les glycans permettent aussi aux glycoprotéines thérapeutiques d'être masquées vis-à-vis des protéases et des protéines du système immunitaire, augmentant ainsi leur temps de demi-vie dans le sérum sanguin (Morell, Gregoriadis, Scheinberg, Hickman, & Ashwell, 1971; Sareneva, Pirhonen, Cantell, & Julkunen, 1995; Schauer, 2000). Plus particulièrement, la présence d'acide sialique sur les résidus galactoses terminaux des O- et des N-glycans joue un rôle crucial dans la stabilité des glycoprotéines. La sialylation a une influence sur le temps de demi-vie de la glycoprotéine dans le système circulatoire (Erbayraktar et al., 2003; Morell et al., 1971; Schauer, 2000). En effet, les glycoprotéines non sialylées présentes dans le sérum sanguin peuvent être reconnues par des récepteurs spécifiques (récepteurs aux résidus galactoses terminaux) du foie et par la suite être dégradées (Morell et al., 1971). Par exemple, dans le cas de l'érythropoïétine humaine

recombinante, il a été démontré que la demi-vie dans le plasma de souris de la protéine non-sialylée (après injection par intraveineuse) est plus de 100 fois plus courte que celle de la protéine sialylée (Erbayraktar et al., 2003). De plus, la sialylation des glycoprotéines leur permet d'être « masquées » vis-à-vis des cellules du système immunitaire (Schauer, 2000). Enfin, la charge négative présentée par l'acide sialique influence les propriétés de la protéine telles que la stabilité thermique, la résistance à la dégradation par des enzymes protéolytiques et la solubilité (Bork, Horstkorte, & Weidemann, 2009; Lawson et al., 1983; Tsuda, Kawanishi, Ueda, Masuda, & Sasaki, 1990).

Tableau 2.2: Influence de la glycosylation sur les propriétés de certaines protéines thérapeutiques recombinantes.

| Propriétés                | Effets   | Glycoprotéines                               | Références  |
|---------------------------|--|--|---|
| Stabilité <i>in vitro</i> | - Diminution de l'agrégation.  | Hormone thyroïdienne $\alpha$                | (Weintraud, Stannard, & Meyers, 1983)                       |
|                           |  | Interféron IFN- $\beta$                      | (Runkel et al., 1998)                                       |
|                           | - Diminution de la dénaturation thermique.   | Glucosidase $\alpha$                         | (Clark, Muslin, & Henson, 2004)                             |
|                           |  | Antitrypsine $\alpha$                        | (Kwon & Yu, 1997)   |
|                           |  | Interféron IFN- $\beta$                      | (Runkel et al., 1998)                                       |
|                           |  | Érythropoïétine                              | (Tsuda et al., 1990)  |
|                           |  | Urokinase $\alpha$                           | (Yang, B. & Li, 2006)                                       |
|                           | - Diminution de la dénaturation par le pH.   | Érythropoïétine                              | (Narhi et al., 1991)  |
|                           |  | Facteur stimulateur de colonies granulocytes | (Ono, 1993)   |
| Stabilité <i>in vivo</i>  | - Amélioration du temps de demi-vie dans la circulation.   | Interféron $\gamma$                          | (Sareneva et al., 1995)                                     |
|                           |  | Protéine C humaine                           | (Grinnell, Walls, & Gerlitz, 1991)                          |
| Immunogénicité            | - Amélioration de la solubilité.   | Érythropoïétine                              | (Sinclair & Elliott, 2005)                                  |
|                           | - Diminution de l'agrégation<br>Diminution de l'immunogénicité.<br>- Les glycans masquent la glycoprotéine vis-à-vis du système immunitaire. | Interféron $\beta$                           | (van Beers, Jiskoot, & Schellekens, 2010)                   |
| Efficacité <i>in vivo</i> | - Amélioration de la bioactivité.<br>- Réduction de la clairance rénale et hépatique.<br>- Résistance aux protéases.                         | Érythropoïétine                              | (Sinclair & Elliott, 2005)                                  |
|                           |  | Antithrombine                                | (Ni, Blajchman, Ananthanarayanan, Smith, & Sheffield, 2000) |
|                           |  | Interleukin-3                                | (Ziltener, Clark-Lewis, Jones, & Dy, 1994)                  |
|                           |  | Interféron $\beta$                           | (Runkel et al., 1998)                                       |
|                           |  | Facteur de coagulation VIIa                  | (Iino, Foster, & Kisiel, 1998)                              |
|                           |  | Anticorps de type IgG                        | (Raju & Scallan, 2007)                                      |

## 2.4 L'amélioration de la production et de la qualité des glycoprotéines thérapeutiques.

Les nombreuses études visant à améliorer les performances des procédés de culture de cellules de mammifère ont fourni des connaissances précieuses concernant l'influence des paramètres de culture sur la production et sur la qualité des protéines recombinantes. Ces études ont aussi permis de déceler les paramètres les plus critiques à contrôler et à exploiter afin d'augmenter les titres et/ou la qualité en protéines recombinantes.

### 2.4.1 Les paramètres affectant les performances des procédés de culture.

En plus d'influencer le rendement en protéines, les conditions d'opération affectent également leur qualité. Le Tableau 2.3 (page 28) présente l'influence de plusieurs paramètres de culture sur la production et la qualité des protéines recombinantes dans plusieurs études. La température de culture, par exemple, peut avoir un effet important. En effet, bien que la plupart des cultures soient réalisées à 37°C, de nombreuses études ont démontré que des températures plus basses peuvent mener à des performances améliorées des procédés de culture de cellules CHO (voir Tableau 2.3 page 28). Il a été proposé qu'une réduction de la température de culture bloque les cellules dans la phase G0/G1, diminuant ainsi la croissance cellulaire au profit d'une augmentation de la productivité spécifique en protéines recombinantes (Yoon, Song, & Lee, 2003). En général, une réduction de la température peut avoir pour conséquences une diminution du taux de croissance (Trummer et al., 2006), une diminution de la consommation de glucose (Barnabé & Butler, 1994) et une diminution de la consommation en oxygène ainsi que de l'activité des protéases dans le milieu de culture (Chuppa et al., 1997). L'effet sur la productivité spécifique semble cependant dépendant de la lignée cellulaire et de la protéine recombinante produite (Yoon, Hwang, & Lee, 2004). En effet, pour la lignée humaine HEK293, nous n'avons pas constaté d'amélioration significative de la production lors de cultures réalisées à 33°C. À l'instar de son effet sur la productivité spécifique, l'effet de la température sur la sialylation semble aussi dépendre du type cellulaire et de la glycoprotéine produite. Dès lors une tendance générale est difficilement observable. Par exemple, Yoon et al (2002) ont constaté une meilleure sialylation de l'érythropoïétine (EPO) et une plus grande bioactivité *in vivo* pour des cultures en mode *batch* de cellules CHO réalisées à 33°C. Kaufmann et al. (2001) ont également observé une plus grande sialylation de la phosphatase alcaline pour des cultures de cellules CHO réalisées avec un

changement de température de 37°C à 30°C en cours de procédé (Kaufmann, Mazur, Marone, Bailey, & Fussenegger, 2001). *A contrario*, un effet néfaste de la réduction de la température sur la sialylation de l'EPO a été observé dans l'étude de Trummer et al. (2006). Dans cette étude, la réduction de la température de 37°C à 33°C en cours de culture a eu pour conséquence une diminution de la sialylation de 20% (Trummer et al., 2006) (voir Tableau 2.3 page 28). Par ailleurs, la diminution de la température améliore généralement la viabilité des cellules en culture, ce qui peut avoir un effet positif sur la glycosylation car cela retarde la phase de libération de glycosidases intracellulaires qui se produit lorsque la viabilité diminue (Chuan et al., 2006). En effet, dans l'étude de Wong et al. (2005), les protéines récoltées en phase de haute viabilité cellulaire (viabilité supérieure à 95%) avaient un contenu en acide sialique plus élevé que celles récoltées en phase de faible viabilité (Chee Fung Wong, Tin Kam Wong, Tang Goh, Kiat Heng, & Gek Sim Yap, 2005). En outre, comme la diminution de la température a aussi été corrélée dans certains cas avec une augmentation de la productivité spécifique, certains auteurs ont envisagé qu'un taux d'expression plus élevé de la glycoprotéine pourrait réduire le temps de traitement intracellulaire alloué à la glycosylation et ainsi provoquer alors la libération de glycoformes moins glycosylés (Hossler et al., 2009). En ce qui concerne le pH et la teneur en oxygène du milieu de culture, des valeurs de pH situées entre 6,8 et 7,2 et des gammes de pO<sub>2</sub> entre 10% et 90% (à saturation dans l'air) sont adéquates pour obtenir le patron de glycosylation souhaité (Aghamohseni et al., 2014; Trummer et al., 2006; Yoon et al., 2004) (voir Tableau 2.3 page 28).

À ce jour, aucune étude n'a encore démontré une influence importante de l'accumulation du lactate dans les cultures sur la glycosylation (Kochanowski, 2005). Par contre, l'accumulation d'ammonium affecte grandement la glycosylation des glycoprotéines et plus particulièrement la sialylation (Aghamohseni et al., 2014; Andersen, Dana C & Goochee, 1995; Gawlitzek et al., 2000; Yang, M. & Butler, 2000). Une concentration dans le milieu aussi faible que 2 mM est déjà inhibitrice pour la sialylation (Andersen, Dana C & Goochee, 1995). L'effet de l'ammonium sur la sialylation est de deux ordres. Tout d'abord, l'ammonium augmente le pH intracellulaire, perturbant ainsi le fonctionnement des enzymes de la sialylation. En effet, le pH de la région trans-golgiennne dans laquelle sont localisées ces enzymes est d'environ 6.5. Des études suggèrent qu'une concentration extracellulaire en ammonium de 10 mM est susceptible d'augmenter le pH trans-golgien de 6,5 à d'environ 7,0, perturbant ainsi les conditions optimales pour l'activité des enzymes sialyltransférases (Andersen, Dana Christian, 1994). Ensuite, il a été observé que, en plus de réduire

la sialylation, les ions ammonium augmentent l'antennarité des structures glycanes. En effet l'ammonium augmente le *pool* d'UDP-N-acétylhexosamine (UDP-GlcNAc et UDP-GalNAc), les nucléotides-oses précurseurs des molécules utilisées dans la N- et la O-glycosylation, ce qui a pour conséquence une augmentation de l'antennarité des structures glycanes (Gawlitzek et al., 2000; Ryll, Valley, & Wagner, 1994). Ces nucléotide-oses sont aussi des compétiteurs de CMP-NANA (molécule précurseur de l'acide sialique) pour l'entrée dans l'appareil de Golgi, ce qui limiterait donc la sialylation (Valley, Nimtz, Conradt, & Wagner, 1999).

La connaissance de l'influence de ces paramètres critiques pour les performances des procédés de culture permet de mieux concevoir les stratégies d'amélioration. Les différentes approches qui ont été suivies dans la littérature peuvent être subdivisées en deux groupes : les techniques impliquant l'amélioration du fonctionnement cellulaire par des moyens de génie génétique, et les techniques basées sur l'optimisation des paramètres de culture, y compris la composition du milieu nutritionnel ainsi que la stratégie d'alimentation.

Tableau 2.3: Quelques exemples de l'influence des paramètres de culture sur la production et la qualité des protéines recombinantes.

| Effet de:        | Stratégie / contexte  | Avantages  | Inconvénients   | Références   |
|------------------|---|--|---|--|
| T°               | Culture <i>batch</i> à 33°C de cellules CHO produisant de l'EPO.  | Plus grande teneur en acide sialique de l'EPO et légèrement plus grande activité <i>in vivo</i> de l'EPO obtenue à 33°C.<br>Haute viabilité cellulaire maintenue plus longtemps.       | /   | (Yoon et al., 2003)                                |
|                  | Changement de la température de 37°C à 30°C ou de 37°C à 33°C en cours de culture de cellules CHO produisant de l'EPO.  | Augmentation de la productivité spécifique lors du changement vers 30°C.   | Réduction de la sialylation de 40% et de 20 % lorsque la température était changée à 30°C et à 33°C respectivement. | (Trummer et al., 2006)                             |
|                  | Réduction de la température de 37°C à 30 °C en cours de culture de cellules CHO produisant la phosphatase alcaline.   | Augmentation du titre maximal en protéine d'un facteur 1,7.<br>Amélioration de la sialylation.<br>Haute viabilité maintenue plus longtemps.  | /   | (Kaufmann et al., 2001)                            |
|                  | Changement de la température de 37°C à 33°C en cours de culture de cellules CHO produisant une cytokine (hGM-CSF).  | Augmentation de la productivité.<br>Pas d'impact sur la qualité des protéines.<br>Haute viabilité cellulaire maintenue plus longtemps.   | /   | (Fogolin et al., 2004)                             |
| pH               | Cultures <i>batch</i> de cellules CHO initiées dans des conditions normales puis en milieu de phase exponentielle, passage en conditions particulières en pH (6,8 à 7,3).                                 | Pas d'impact du pH sur la sialylation dans la gamme étudiée (6,8 - 7,3).   | /   | (Trummer et al., 2006)                             |
|                  | Cultures <i>batch</i> de cellules CHO produisant un anticorps monoclonal dans lesquelles le pH est maintenu à 6,8 par ajout d'acide lactique.   | Amélioration de la sialylation et de la galactosylation.   | Réduction de la productivité spécifique en anticorps.   | (Aghamohseni et al., 2014)                         |
|                  | Étude de l'effet du pH et de la température (37°C et 32,5°C) sur les cultures de cellules CHO produisant de l'EPO.  | Le contenu en acide sialique des protéines en phase stationnaire de culture est maximal à des pH compris entre 6,85 et 7,20.   | /   | (Yoon et al., 2004)                                |
| pO <sub>2</sub>  | Culture <i>batch</i> initiée dans des conditions normales puis en milieu de phase exponentielle de croissance, passage en conditions particulières en OD (10% à 100%).                                    | La sialylation n'est pas significativement impactée dans la gamme de teneur en oxygène dissous étudiée 10-90 % air sat.  | La sialylation est significativement réduite à une teneur en oxygène dissous de 100 % air sat.                      | (Trummer et al., 2006)                             |
|                  | Étude de l'effet de la OD (10%, 50%, 100%) sur la glycosylation d'un anticorps produit par une lignée hybridome.  | /  | La réduction de la OD diminue la galactosylation de l'anticorps.  | (Kunkel, Jan, Jamieson, & Butler, 1998)            |
| pCO <sub>2</sub> | Analyse du contenu en acide sialique d'une glycoprotéine exprimée à la surface de cellules neuronales. Les cellules sont cultivées en adhésion dans différentes conditions de teneur en CO <sub>2</sub> . | /  | la polysialylation de la glycoprotéine diminue avec l'augmentation de la teneur en CO <sub>2</sub> .                | (Zanghi, Schmelzer, Mendoza, Knop, & Miller, 1999) |
| Osmolalité       | Culture <i>batch</i> de cellules CHO. L'osmolalité du milieu de culture a été augmentée d'environ 40%.  | /  | Réduction du taux spécifique de croissance.<br>Augmentation du taux de production de lactate et d'ammonium.         | (Zhu, M. M. et al., 2005)                          |
| Viabilité        | Cultures <i>fed-batch</i> de cellules CHO produisant l'interféron $\gamma$  | Les protéines récoltées lorsque la viabilité était élevée (>95%) avaient un contenu en acide sialique plus élevé que celles récoltées lorsque la viabilité était plus faible (70-80%). | /   | (Chee Fung Wong et al., 2005)                      |



## 2.4.2 Les stratégies d'amélioration basées sur le génie génétique.

Le Tableau 2.4 (page 31) et le Tableau 2.5 (page 34) présentent différentes stratégies d'amélioration de la production et de la qualité des protéines recombinantes avec une notation permettant d'apprécier leur effet sur les performances de la culture.

L'altération du métabolisme central carboné par génie génétique a été largement étudiée dans le but d'améliorer l'utilisation des nutriments par les cellules et ainsi de réduire l'accumulation des métabolites toxiques tels que le lactate et l'ammonium. Ces techniques ont donc principalement visé les voies impliquées dans le métabolisme du glucose et de la glutamine. Ceux-ci ont consisté en la surexpression ou la répression de l'activité d'enzymes clés. Par exemple, parmi les stratégies de réduction de l'accumulation du lactate, la réduction de l'expression de l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) ou la surexpression de l'enzyme pyruvate carboxylase de levure (PYC2) sont parmi celles qui ont donné les meilleurs résultats (Chen, K., Liu, Xie, Sharp, & Wang, 2001; Elias et al., 2003; Irani, Noushin et al., 1999; Zhou, M. et al., 2011). Par ailleurs, la surexpression du gène de la glutamine synthétase a eu un effet bénéfique sur la réduction de l'accumulation d'ammonium (Birch et al., 1994; Noh & Lee, 2016). Toutefois, lorsqu'on parcourt la littérature, il est assez frappant de constater que pour beaucoup de ces stratégies d'altération du métabolisme du carbone, l'effet sur la qualité de la protéine recombinante a été très peu ou pas du tout évalué. Cela représente un manque important car, comme discuté au point 2.2.4 (page 18), le métabolisme du glucose et de la glutamine peut influencer significativement la glycosylation des protéines.

D'autre part, maintenir une haute viabilité cellulaire plus longtemps dans les cultures permet d'améliorer la production et la qualité. Cela peut par exemple être réalisé grâce à la surexpression de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-xL ou la *heat shock protein 27* (Tan et al., 2015) (voir Tableau 2.4, page 31). Cependant, comme ces stratégies n'améliorent pas nécessairement le métabolisme nutritionnel des cellules, le niveau d'accumulation des métabolites toxiques reste inchangé. Ces métabolites pourraient donc masquer voire atténuer l'éventuelle influence bénéfique de la modification génétique sur la qualité de la protéine recombinante.

Enfin, il est également possible d'influencer plus directement le mécanisme de la glycosylation en modifiant l'expression d'enzymes spécifiques. Il a été par exemple démontré que la surexpression de l'enzyme  $\alpha$ -2,6-sialyltransférase, en plus d'augmenter la proportion d'acide

sialique lié en  $\alpha$ 2,6, améliore sensiblement la sialylation de manière générale (Onitsuka, Kim, Ozaki, Kawaguchi, Honda, Kajiura, Fujiyama, Asano, Kumagai, & Ohtake, 2012).

Tableau 2.4: Stratégies d'amélioration de la production et de la qualité des protéines recombinantes basées sur le génie génétique.

| Stratégies basées sur le génie génétique    |   |         |          |                |            |                      |   |
|---|---|---------|----------|----------------|------------|----------------------|---|
| Stratégies <sup>1</sup>                     |   | Lactate | Ammonium | Croissance     | Production | Qualité              | Références  |
| Altération du métabolisme du carbone        | Réduction de l'expression de la LDH               | +++     | /        | ±              | ++         | ±                    | (Zhou, M. et al., 2011)<br>(Chen, K. et al., 2001)<br>(Kim, S. H. & Lee, 2007a)                   |
|   | Surexpression de la PC humaine                    | +       | /        | ±              | /          | /                    | (Kim, S. H. & Lee, 2007b)   |
|   | Surexpression de la PYC2                          | +++     | ±        | +++            | +++        | /                    | (Vallée et al., 2014)<br>(Irani, Noushin et al., 1999)<br>(Elias et al., 2003)                    |
|   | Surexpression de la MDH II                        | +       | /        | ++             | +          | /                    | (Chong et al., 2010)  |
|   | Surexpression de la GPDH                          | ±       | ±        | ±              | ±          | /                    | (Arnold et al., 2016)   |
|   | Surexpression de la glutamine synthetase          | /       | +++      | ±              | ++         | /                    | (Birch et al., 1994)  |
| Expression de protéines anti-apoptotiques   | Surexpression de Bcl-xL                           | ±       | ±        | ++ (Viabilité) | +          | +                    | (Lee, Kim, & Lee, 2015)   |
|   | Surexpression de la <i>heat shock protein 27</i>  | ++      | ++       | +++            | +++        | ±                    | (Tan et al., 2015)  |
| Altération du mécanisme de la glycosylation | Surexpression de l'α2,6-sialyltransferase         | /       | /        | —              | —          | +++<br>(sialylation) | (Onitsuka, Kim, Ozaki, Kawaguchi, Honda, Kajiura, Fujiyama, Asano, Kumagai, Ohtake, et al., 2012) |
|   | Surexpression de N-acétylglucosaminyltransferases | /       | /        | ±              | ±          | ++<br>(sialylation)  | (Cha, Lim, Yeon, Hwang, & Kim, 2017)  |
|   | Surexpression de GNE muté                         | /       | /        | /              | /          | +<br>(sialylation)   | (Son et al., 2011)  |
| Altération du cycle cellulaire              | Suppression de l'expression des microARN (miR-7)  | /       | /        | +              | ++         | /                    | (Barron et al., 2011)   |

<sup>1</sup> Pour chaque stratégie, l'évaluation de la performance a été réalisée par comparaison aux conditions contrôles définies dans l'étude concernée : +++ signifie une amélioration de 100% ou plus; ++ signifie une amélioration comprise entre 100% et 50%, + signifie une amélioration comprise entre 50% et 0%, ± signifie que les performances n'ont pas été significativement améliorées. Lorsque la stratégie réduit les performances, un signe — est représenté. Lorsque le critère de performance n'a pas été évalué dans l'étude, une barre oblique est représentée.

### **2.4.3 Les stratégies d'amélioration basées sur la composition du milieu de culture.**

Bien que les techniques de génie génétiques permettent d'influencer significativement le phénotype cellulaire, elles peuvent s'avérer complexes, coûteuses et chronophages. Comme alternative, la manipulation de la composition du milieu de culture peut conduire à des changements dans le comportement cellulaire tout aussi importants et permettre de moduler la production et la qualité de la protéine recombinante dans les limites du potentiel des cellules.

Parmi les stratégies qui ont été envisagées, le maintien en faible concentration des principaux nutriments, c'est-à-dire le glucose et la glutamine, a permis d'améliorer de manière importante le métabolisme des cellules. Cela a mené à des cultures avec une plus faible production de métabolites toxiques et des titres en protéines sensiblement améliorés (Chee Fung Wong et al., 2005). La substitution des nutriments par des molécules métabolisables plus lentement ou moins génératrices de lactate et d'ammonium peut également avoir un impact bénéfique sur la productivité cellulaire. Cependant, les avantages de ces stratégies sont limités par l'influence importante qu'ils peuvent avoir sur la qualité des glycoprotéines. Par exemple, il est reconnu que la disponibilité d'une concentration suffisante de glucose est un facteur important pour assurer une bonne glycosylation (Liu, B. et al., 2014). D'autre part, comme discuté au point 2.2.4 (page 18), la glutamine est également un métabolite important dans le mécanisme de glycosylation. Dès lors, son retrait ou sa substitution dans le milieu de culture peut représenter un risque important pour la qualité de la protéine recombinante.

La glycosylation peut être améliorée en supplémentant le milieu de culture avec des molécules précurseurs des glycanes. C'est le cas bien évidemment du glucose mais aussi d'autres sucres tels que le galactose ou le mannose. Patrick Hossler et ses collaborateurs ont étudié l'effet de plusieurs sucres non communément utilisés en culture de cellules de mammifère sur la glycosylation. Ils ont démontrés que ces sucres (ex : le raffinose, le lactose, le trehalose, le turanose, le palatinose, etc...) sont capables de moduler la N-glycosylation sans influencer négativement les performances cellulaires en terme de croissance et de production protéique (Hossler, Racicot, Chumsae, McDermott, & Cochran, 2016). En outre, l'utilisation de précurseurs des nucléotides-oses comme le glucosamine (GlcN) ou le ManNAc est aussi reconnue pour moduler la glycosylation (Baker et al., 2001; Gu & Wang, 1998). Cependant, il s'avère parfois nécessaire de

les supplémenter en combinaison avec des nucléosides comme l'uridine ou la cytidine qui sont deux molécules également impliquées dans la synthèse des nucléotide-oses (Wong, N. S. et al., 2010). Enfin, certaines enzymes impliquées dans la glycosylation comme par exemple les galactosyltransférases nécessitent la présence de co-facteurs pour activer la catalyse. Il s'agit généralement de cations métalliques divalents tels que le manganèse ou le cobalt dont la supplémentation dans les cultures a également démontré influencer positivement la glycosylation des protéines recombinantes en culture de cellules de mammifère (Crowell, Grampp, Rogers, Miller, & Scheinman, 2007; Hossler, Racicot, & McDermott, 2014),

Toutes ces molécules représentent autant de variables qui peuvent être utilisées pour moduler la glycosylation. Dans le contexte du contrôle de la qualité, elles représentent des leviers d'action pouvant permettre d'orienter la glycosylation de la protéine recombinante vers le profil désiré; ce qui est d'un intérêt crucial, particulièrement dans le domaine du développement des biosimilaires.

Tableau 2.5: Stratégies d'amélioration de la production et de la qualité des protéines recombinantes basées sur le choix des nutriments et des suppléments.

| Stratégies basées sur les nutriments et les suppléments |  |         |          |                    |            |                      |  |
|---|--|---------|----------|--------------------|------------|----------------------|--|
| Stratégies <sup>2</sup>                                 |  | Lactate | Ammonium | Croissance         | Production | Qualité              | Références   |
| Stratégie basée sur le métabolisme du glucose           | Alimentation en glucose                            | —       | +++      | +                  | +          | +++                  | (Seo et al., 2014)   |
|   | Glucose en faible concentration                    | +       | +        | —                  | +          | —                    | (Hayter et al., 1992)                                      |
|   | Substitution du glucose par le galactose           | +++     | —        | —                  | —          | /                    | (Altamirano, C, Paredes, Cairo, & Godia, 2000)             |
|   | Glucose et glutamine en faible concentration       | +++     | ++       | ±                  | +++        | —<br>(sialylation)   | (Chee Fung Wong et al., 2005)                              |
|   | Alimentation en lactate                            | /       | +++      | ±                  | ±          | ±                    | (Li, J., Wong, Vijayasankaran, Hudson, & Amanullah, 2012)  |
| Stratégie basée sur le métabolisme de la glutamine      | Culture sans glutamine                             | /       | +        | ±                  | ±          | ±                    | (Taschwer et al., 2012)                                    |
|   | Maintien de la glutamine en faible concentration   | —       | ++       | ++                 | +++        | —<br>(sialylation)   | (Chee Fung Wong et al., 2005)<br>(Maranga & Goochee, 2006) |
|   | Substitution de la glutamine par l'α-cétoglutarate | /       | +++      | +++<br>(viabilité) | ±          | +++<br>(sialylation) | (Ha & Lee, 2014)   |
|   | Substitution glutamine par le glutamate            | /       | +++      | —                  | ++         | +                    | (Hong, Cho, & Yoon, 2010)                                  |
| Ajout de sucres et de précurseurs de la glycosylation   | Ajout de galactose                                 | ±       | ±        | ±                  | ±          | +                    | (Liu, J. et al., 2015)                                     |
|   | Ajout de GlcN ± cytidine                           | ±       | —        | —                  | —          | +                    | (Wong, N. S. et al., 2010)                                 |
|   | Ajout de GlcNAc                                    | /       | /        | ±                  | ±          | —                    | (Blondeel et al., 2015)                                    |
|   | Ajout de ManNAc ± cytidine                         | ±       | ±        | ±                  | +          | +                    | (Wong, N. S. et al., 2010)                                 |
| Ajout de cofacteur de la glycosylation                  | Ajout de manganèse                                 | /       | /        | /                  | ±          | +                    | (Crowell et al., 2007)                                     |
|   | Ajout de cobalt                                    | —       | /        | ±                  | ±          | +                    | (Hossler et al., 2014)                                     |

<sup>2</sup> L'évaluation des performances de chaque stratégie a été réalisée de la même manière que pour le Tableau 2.4.

#### **2.4.4 La glycosylation : un effet global.**

À l'instar des autres modifications post-traductionnelles des protéines, on peut voir la glycosylation des protéines comme un mécanisme au travers duquel le vivant crée de la variabilité, de la diversité supplémentaire dans l'expression des protéines, ce qui lui permet de moduler finement le phénotype cellulaire pour ainsi pouvoir répondre encore plus adéquatement aux fluctuations des conditions dans lequel l'organisme se développe. C'est pourquoi, chez l'humain par exemple, le profil de glycosylation des protéines peut varier en fonction du type de cellule, de la localisation de celles-ci, de l'âge et du sexe de la personne et même du moment de la journée (Ding et al., 2011; Kozak et al., 2016; Miura et al., 2015). Ainsi, lorsqu'on altère la glycosylation de la protéine recombinante, il va de soi qu'on influence également le profil de glycosylation de toutes les glycoprotéines endogènes de la cellule. Chez l'homme, par exemple, on estime que plus de 50% des protéines sont glycosylées. Il est donc fort possible qu'une stratégie améliorant la glycosylation de la protéine recombinante ait aussi un effet sur l'activité de plusieurs enzymes cellulaires endogènes et influence, de manière bénéfique ou pas, plusieurs autres fonctions du métabolisme cellulaire. À cet égard, tout comme cela est également valable pour les stratégies d'amélioration de la productivité, une stratégie améliorant la glycosylation peut significativement impacter la croissance et la production de la protéine recombinante illustrant ainsi l'importance de garder une vision holistique lorsqu'on étudie le fonctionnement cellulaire car les nombreuses voies impliquées sont souvent interconnectées.

## 2.5 L'évaluation et contrôle de la qualité des glycoprotéines.

En lançant l'initiative *Process Analytical Technology* (PAT) en 2004, la *Food and Drug Administration* (FDA) encourage les industries biopharmaceutiques à implémenter une démarche proactive vis-à-vis de la qualité dans les procédés de production (Food & Administration, 2004). Dans cette optique, la mise en place d'un outil de suivi de la glycosylation permettrait de détecter de manière précoce les écarts aux spécifications du produit en cours de culture, permettant ainsi l'arrêt de la culture ou l'application de mesures correctives afin d'augmenter les chances d'obtenir la qualité désirée en fin de production (Teixeira, Oliveira, Alves, & Carrondo, 2009). Cependant, à ce jour, parmi les nombreuses techniques qui existent pour l'évaluation de la glycosylation, il n'y pas de consensus sur la technique appropriée pour le suivi de cet important attribut de qualité.

Le Tableau 2.6 (page 37) compare plusieurs techniques parmi les plus utilisées pour l'analyse de la glycosylation. La plupart des méthodes pour l'analyse de la glycosylation et de la sialylation requièrent des échantillons purifiés. Cela implique aussi des étapes de séparation chromatographique généralement longues et contraignantes rendant ces méthodes peu appropriées pour l'analyse rapide de nombreux échantillons. Les techniques telles que la chromatographie liquide à haute performance, la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire sont d'une grande sensibilité et fournissent des résultats très fiables. Cependant elles nécessitent des équipements onéreux et une grande expertise pour leur utilisation. De plus, ces techniques requièrent des étapes de clivage chimique ou enzymatique des glycanes suivies de leur modification chimique pour permettre leur détection (Geyer & Geyer, 2006). Ces étapes doivent souvent être optimisées au travers de plusieurs expériences, ce qui augmente le temps requis pour l'analyse (Campbell & Yarema, 2005). En outre, ces étapes préparatoires présentent elles-mêmes le risque de modifier les protéines et donc d'induire un biais dans l'analyse. Tout cela rend donc ces techniques peu appropriées pour une utilisation de routine ou pour le suivi de la glycosylation en cours de culture. La méthode idéale devrait permettre une analyse rapide et précise n'impliquant pas plusieurs étapes de préparation de l'échantillon.



Tableau 2.6 : Comparaison de plusieurs techniques d'analyse de la glycosylation

| Technique  | Principe en bref  | Avantages   | Inconvénients  | Références   |
|--|---|---|--|--|
| <b>SDS-PAGE</b>  | Migration des glycoprotéines sous l'effet d'un champ électrique dans un gel de polyacrylamide permettant leur séparation selon leur poids moléculaire.  | Simple, peu onéreux et rapide.<br>Différences dans la macrohétérogénéité détectables.   | Très faible résolution pour des différences dans la microhétérogénéité (ex: la sialylation).<br>Nécessité de purifier la glycoprotéine au préalable.       | (Geyer & Geyer, 2006)  |
| <b>Focalisation isoélectrique</b>  | Séparation des glycoprotéines selon leur point isoélectrique.   | Matériel simple<br>Permet la séparation des glycoprotéines en fonction du degré de sialylation ou (de fucosylation).  | Nécessité de purifier la glycoprotéine au préalable.   | (Yoon et al., 2004)<br>(Chuan et al., 2006)  |
| <b>Électrophorèse capillaire</b>   | Séparation sous l'influence d'un champ électrique de l'échantillon selon le rapport charge / taille dans un capillaire rempli d'un électrolyte.   | Très bonne résolution pour l'évaluation de la microhétérogénéité.   | Pas d'information sur la nature des glycans attachés à la glycoprotéine.   | (Geyer & Geyer, 2006)  |
| <b>Lectin Blot</b>   | De même que pour un <i>Western-Blot</i> , après SDS-PAGE, les glycoprotéines sont transférées sur une membrane avant d'être analysées par des lectines marquées.  | Simple et rapide  | Spécificité ambiguë de certaines lectines.   | (Sato, 2014)   |
| <b>Enzyme-linked lectin assays (ELLAs) et Antibody linked lectin assays (ABELLA)</b> | L'immobilisation de la glycoprotéine sur une surface de plaque de type ELISA ou sa capture à partir du surmageant à l'aide d'un anticorps est suivi du blocage de la surface et ensuite de la détection des glycans à l'aide de lectines biotinylées. | Ne nécessite pas d'équipement complexe<br>Méthode rapide<br>Analyse de nombreux échantillons en une fois.   | Interférence possible due à l'éventuelle glycosylation de l'agent de blocage (ex: BSA) ou de l'anticorps de capture.                                       | (Thompson, Creavin, O'Connell, O'Connor, & Clarke, 2011)<br>(Kim, H. J., Lee, & Kim, 2008) |
| <b>Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire</b>                               | Utilisation d'un champ magnétique pour modifier les "spins" nucléaires des atomes et ainsi identifier la nature et la stéréochimie des liaisons entre les atomes.   | Méthode très sensible.<br>Permet l'identification structurelle des glycans sans ambiguïté.  | Complexité de l'équipement et de la technique.<br>Ne permet pas l'analyse à grande échelle.<br>Technique onéreuse.<br>Nécessité de purifier l'échantillon. | (Thompson et al., 2011)<br>(Geyer & Geyer, 2006)   |
| <b>Spectrométrie de masse</b>  | Ionisation des molécules de l'échantillon et séparation en fonction de leur rapport masse / charge (m/z)  | Extrêmement sensible  | Nécessité de purifier l'échantillon au préalable<br>Technique onéreuse et complexe qui nécessite une grande expertise.                                     | (Campbell & Yarema, 2005)  |
| <b>Chromatographie à interaction hydrophile</b>                                      | Les glycans sont séparés selon leur interaction avec une phase stationnaire hautement polaire.  | Bonne séparation des glycans, en particulier les isomères structuraux.  | Séparation glycans / protéine au préalable.<br>Conjugaison préalable des glycans avec un fluorophore pour les rendre détectables.                          | (Marino et al., 2010)  |
| <b>Chromatographie par affinité de lectines</b>                                      | Des lectines liées dans une matrice (ex: gel d'agarose) permettent l'isolation, et la caractérisation de glycans spécifiques ou de glycoformes d'un échantillon.  | Bonne spécificité   | Complexité de l'équipement.<br>Caractérisation partielle des glycans (dépend des lectines utilisées)   | (Thompson et al., 2011)<br>(Geyer & Geyer, 2006)   |
| <b>Résonance plasmonique de surface associée aux lectines</b>                        | La liaison d'une molécule à son ligand provoque un changement dans l'indice de réfraction qui est détecté en temps réel, permettant ainsi déterminer des cinétiques d'interaction.  | Ne nécessite pas de purification de la glycoprotéine au préalable<br>Information quantitative et qualitative<br>Possibilité d'être associé à un bioréacteur | Technique onéreuse.<br>Caractérisation partielle des glycans (dépend des lectines utilisées)   | (Liljeblad, Lundblad, & Pålsson, 2002)   |

### **2.5.1 La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS).**

La chromatographie en phase liquide associée à l'analyse par spectrométrie de masse (LC-MS) s'est établie comme une méthode de choix pour l'analyse de la glycosylation. Les analyses consistent généralement en deux étapes : la séparation des glycoprotéines puis l'identification des différents glycoformes présents.

La séparation/isolation des glycoprotéines peut être réalisée par chromatographie liquide. Par exemple, les différents glycoformes de la protéine d'intérêt peuvent être séparés par chromatographie d'échange d'ions (Behan & Smith, 2011; Townsend & Hardy, 1991). En effet, due à la différence dans la composition en glycans, les glycoformes peuvent varier dans leur point isoélectrique ce qui permet leur séparation dans une colonne échangeuse d'ions. Il faut néanmoins rester vigilant car des différences dans la charge globale de la protéine n'impliquent pas nécessairement des différences de glycosylation (Leblanc, Ramon, Bihoreau, & Chevreux, 2017). En effet, des troncatures de la chaîne polypeptidique de la protéine recombinante peuvent également se produire donnant éventuellement lieu à la perte d'acides aminés chargés et donc à des variantes plus acides ou plus basiques de la protéine d'intérêt (Schiestl et al., 2011). Une autre façon de séparer les glycoprotéines consiste à exploiter l'affinité de certaines lectines pour les glycans. La chromatographie d'affinité utilisant les lectines permet de séparer un mélange de glycoprotéines sur la base du glycoforme (Yang, Z. & Hancock, 2005). Par exemple, la lectine Jacalin est couramment utilisée pour séparer de manière très spécifique les protéines O-glycosylées (Tachibana et al., 2006).

La spectrométrie de masse est une technique permettant de déterminer la nature des différents constituants présents dans un échantillon en mesurant leur masse. Pour cela, l'échantillon est d'abord vaporisé et ionisé. Les ions résultants sont accélérés et soumis à un champ magnétique ou électrique qui va influencer leur trajectoire. Ainsi la déviation des ions sera fonction de leur masse mais également de leur charge. Le rapport masse/charge permet d'identifier les différentes molécules présentes dans l'échantillon. Les différentes techniques de spectrométrie de masse se distinguent par la source d'ionisation ou le type d'analyseur. Lorsque la glycoprotéine est de faible poids moléculaire et/ou lorsqu'elle arbore un nombre limité de chaînes de glycans, elle peut être analysée directement dans son état intact, c'est-à-dire la glycoprotéine dans son entièreté. Ainsi, si

on connaît la masse exacte de la protéine (à l'état non glycosylé), la différence avec la masse de ses glycoformes permet de déterminer la nature des glycans présents (Morelle, Canis, Chirat, Faid, & Michalski, 2006). Cependant, pour des glycoprotéines de plus grande masse ou très glycosylées, il peut s'avérer nécessaire de cliver au préalable les structures glycanes ou bien de découper la chaîne polypeptidique de la protéine en plusieurs petites fractions. Dans ce cas, la différence entre les masses moléculaires mesurées avant et après le retrait des glycans (ou le fractionnement) permet de déterminer l'état de glycosylation. Comme l'analyse de la glycoprotéine à l'état intact implique moins d'étapes de préparation de l'échantillon, elle présente l'avantage d'être rapide et moins coûteuse (Dotz et al., 2015). Cependant, l'analyse au niveau du glycopeptide ou de la chaîne de glycans fournit une information plus précise ce qui en fait la méthode la plus traditionnellement utilisée dans l'industrie pour l'analyse de la variabilité entre les lots de glycoprotéines (Higgins, 2010). Toutefois, bien que le clivage des N-glycans puisse facilement être réalisé à l'aide de l'enzyme PNGase F, il n'existe actuellement pas de d'enzyme qui retire de manière efficace les O-glycans. Par conséquent, le clivage des O-glycans se fait chimiquement au travers d'un processus laborieux impliquant plusieurs étapes pour le retrait successif des différents glycans (Zauner et al., 2012).

L'analyse par LC-MS fournit une information fiable sur le profil de glycosylation des glycoprotéines. Néanmoins, de nos jours, cette technique est encore longue et laborieuse ce qui la rend peu adaptée pour une analyse rapide et routinière et donc peu appropriée pour le suivi de la glycosylation en cours de culture.

### **2.5.2 Les lectines, des outils précieux pour l'étude de la glycosylation.**

Les lectines sont des protéines d'origine animale, bactérienne ou végétale qui sont capables d'interagir de manière spécifique et réversible avec les glycans. Elles forment des liaisons avec les glycans au travers de liens hydrogène, de complexes de coordination ou d'interactions hydrophobes et de van der Waals (Elgavish & Shaanan, 1997; Hirabayashi, 2014). Elles sont devenues des outils incontournables pour l'étude du profil de glycosylation des protéines (Hirabayashi, 2014; Wu, Lisowska, Duk, & Yang, 2009). De nombreuses lectines présentant une spécificité pour une grande variété de glycans ont été découvertes et sont actuellement disponibles sur le marché (Ambrosi, Cameron, & Davis, 2005). Les lectines ont été largement utilisées pour sonder les glycoprotéines et détecter la présence de glycans particuliers tels que le galactose, l'acide sialique, le mannose ou

encore le fucose (Chen, S. et al., 2007; Kim, H. J. et al., 2008). Le Tableau 2.7 ci-dessous présente quelques-unes des lectines parmi les plus utilisées pour l'étude de la glycosylation.

Tableau 2.7 : Présentation de quelques lectines pour l'analyse des glycoprotéines.

| Abréviation<br>(ou nom courant) | Origine  | Spécificité          | Références  |
|---------------------------------|--|----------------------|---|
| LFA                             | <i>Limax flavus</i><br>(La limace)                     | Acide sialique       | (Kurachi et al., 1998)                                  |
| MALII                           | <i>Maackia amurensis</i><br>(Un arbre)                 | Acide sialique       | (Wang, W.-C. & Cummings, 1988)                          |
| SNA                             | <i>Sambucus nigra</i><br>(Un arbuste)                  | Acide sialique       | (Shibuya et al., 1987)                                  |
| AAL                             | <i>Aleuria aurantia</i><br>(Un champignon)             | Fucose               | (Yamashita, Kochibe, Ohkura, Ueda, & Kobata, 1985)      |
| RSL                             | <i>Ralstonia solanacearum</i><br>(Une bactérie)        | Fucose               | (Sudakevitz, Imberty, & Gilboa-Garber, 2002)            |
| ECL                             | <i>Erythrina cristagalli</i><br>(Un arbre)             | Galactose            | (Iglesias, Lis, & Sharon, 1982)                         |
| PNA                             | <i>Arachis hypogaea</i><br>(L'arachide)                | Galactose            | (Chacko & Appukuttan, 2001)                             |
| RCA                             | <i>Ricinus communis</i><br>(Un arbrisseau)             | Galactose            | (Olsnes, Saltvedt, & Pihl, 1974)                        |
| BPA                             | <i>Bauhinia purpurea</i><br>(Un arbre)                 | Galactose et GalNAc  | (Wu, Wu, Liu, & Singh, 2004)                            |
| ACL                             | <i>Amaranthus caudatus</i><br>(L'amarante)             | GalNAc et Gal-GalNAc | (Wu et al., 2009)                                       |
| Jacalin                         | <i>Artocarpus integrifolia</i><br>(Le Jacquier, fruit) | GalNAc et Gal-GalNAc | (Wu, Wu, Lin, Lin, & Liu, 2003)                         |
| ABL                             | <i>Agaricus bisporus</i><br>(Un champignon)            | Galactose et GlcNAc  | (Nakamura-Tsuruta, Kominami, Kuno, & Hirabayashi, 2006) |
| Con A                           | <i>Canavalia ensiformis</i><br>(Le haricot)            | Mannose              | (Katrlik, Škrabana, Mislovičová, & Gemeiner, 2011)      |
| LCA                             | <i>Lens culinaris</i><br>(La lentille cultivée)        | Mannose              | (Maupin, Liden, & Haab, 2012)                           |
| PSA                             | <i>Pisum sativum</i><br>(Le pois cultivé)              | Mannose et glucose   | (Kornfeld, Reitman, & Kornfeld, 1981)                   |

La grande spécificité des lectines permet, dans certains cas, de distinguer le type de liaison qui est réalisé entre le monosaccharide visé et son partenaire sur la structure glycane. Par exemple, la lectine *Sambucus nigra* (SNA) est largement utilisée pour détecter l'acide sialique lié en  $\alpha 2,6$  tandis que la lectine MALII lie préférentiellement l'acide sialique lié en  $\alpha 2,3$ . En plus de l'influence du type de liaison, l'affinité d'une lectine pour un glycan en particulier peut aussi être influencée par son environnement, c'est à dire la nature des glycans environnants. C'est le cas par exemple de la lectine spécifique au mannose, *Lens culinaris* (LCA), dont l'affinité pour le mannose est grandement augmentée lorsque un fucose est présent dans un certain contexte sur la structure glycane (Maupin et al., 2012).

Cependant, les lectines peuvent aussi présenter plusieurs spécificités à la fois. En effet, une même lectine peut interagir, à des niveaux d'affinité divers, avec différents types de glycans. Cela peut poser un problème lorsqu'on cherche à identifier sans ambiguïté un profil de glycosylation. C'est la raison pour laquelle de nombreuses études combinent plusieurs lectines lors des analyses afin de mieux discriminer les différents glycans présents sur une glycoprotéine. Il existe actuellement sur le marché des « *lectin microarrays* » qui sont des plaques contenant un panel de lectines présentant des spécificités différentes (Hu & Wong, 2009). Celles-ci sont utilisées pour déterminer une « empreinte » du profil de glycosylation des protéines (Pilobello, Krishnamoorthy, Slawek, & Mahal, 2005; Rosenfeld et al., 2007).

Enfin, comme noté brièvement au point précédent, l'utilisation des lectines peut donner lieu à de nouvelles techniques d'analyse de la glycosylation inspirées de méthodes plus traditionnelles. C'est par exemple le cas de la chromatographie d'affinité utilisant des lectines, de la technique ELLA, de la technique *Lectin Blot* ou encore de la technique de résonance plasmonique de surface exploitant l'affinité des lectines (voir le Tableau 2.6, page 37). Comme nous le verrons dans le point suivant, cette dernière technique représente un outil puissant pour l'analyse de la glycosylation des protéines et présente des particularités intéressantes dans le contexte du suivi de la glycosylation en cours de culture.

### 2.5.3 La résonance plasmonique de surface.

La résonance plasmonique de surface (SPR) est une technique qui permet de mesurer en temps réel l'interaction entre un analyte et son ligand.

Cette technologie se base sur un phénomène physique qui se produit lorsqu'une lumière polarisée est envoyée sur un milieu diélectrique délimité par une fine couche métallique (voir Figure 2.7). À un certain angle d'incidence du rayon lumineux, la lumière transfère une partie de son énergie aux électrons du métal ce qui se traduit par une diminution de l'intensité lumineuse réfléchie (De Crescenzo, Boucher, Durocher, & Jolicoeur, 2008; Englebienne, Hoonacker, & Verhas, 2003). Cet angle appelé angle de réfraction dépend des indices de réfraction des milieux de part et d'autre de la fine couche métallique. L'accumulation de matière à la surface du métal influence donc directement cet angle de réfraction et sa mesure permet de suivre en temps réel la dynamique de l'interaction entre un ligand immobilisé à la surface et un analyte injecté transitoirement sur la surface.

Parmi les différentes techniques d'immobilisation du ligand sur la surface SPR, le couplage par les liaisons amines est la plus simple et la plus rapide (Johnsson, Löfås, & Lindquist, 1991). Dans cette technique, les groupements carboxyles greffés sur la fine surface d'or sont activés par réaction avec le N-hydroxysuccinimide (NHS) et l'hydrochlorure de 1-Ethyl-3-carbodiimide (EDC) avant l'injection du ligand pour permettre la réaction avec les amines présentes sur la chaîne polypeptidique. Cette méthode d'immobilisation ne permet pas de contrôler l'orientation du ligand sur la surface mais elle permet néanmoins d'avoir une immobilisation rapide avec un nombre généralement suffisant de ligands orientés correctement pour interagir avec l'analyte. Le résultat d'une expérience SPR se présente sous la forme d'un sensorgramme, c'est-à-dire un graphique représentant la variation de l'angle de réfraction, exprimé en unité de résonance (RU) ( $1000 \text{ RU} \approx$  variation de  $0.1^\circ$ ) en fonction du temps. L'injection de l'analyte donne donc lieu à une augmentation du signal qui correspond à l'accumulation de masse sur la surface suite à l'interaction de l'analyte avec le ligand. Après l'injection de l'analyte, seul le tampon circule dans la cellule d'écoulement, ce qui permet d'observer une phase de dissociation (voir Figure 2.7 B). La dynamique d'association et de dissociation est directement dépendante de l'affinité entre le ligand et l'analyte. La surface peut par la suite être régénérée, c'est-à-dire débarrassée des protéines qui y sont liées de manière non covalente, grâce à l'injection d'une solution de régénération,

généralement un acide très peu concentré. Les expériences peuvent ainsi continuer tant que la capacité de la surface à lier le ligand est maintenue.

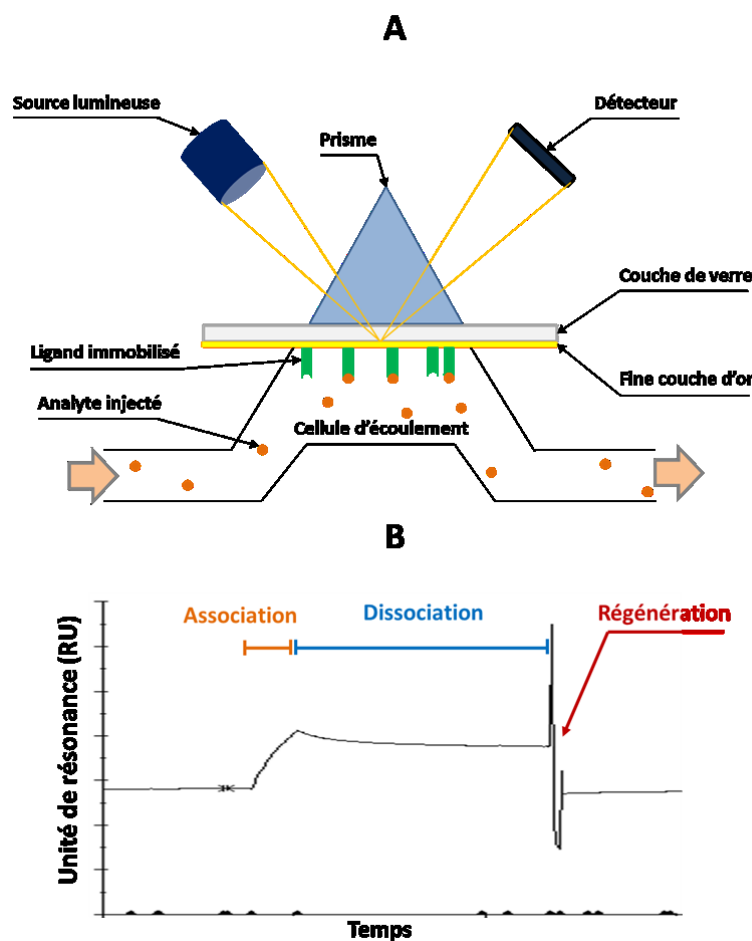


Figure 2.7: La résonance plasmonique de surface. Représentation schématisée d'une cellule d'écoulement (A). Sensorgramme représentant l'interaction entre un analyte et son ligand (phase d'association), suivi de sa dissociation et de la régénération de la surface (B).

L'avantage de cette technique réside dans sa précision, dans la faible quantité de matériel nécessaire (protéines en concentration de l'ordre du nM) et surtout dans l'absence d'étapes d'étiquetage ou de modification chimique de l'échantillon. Elle nécessite donc très peu de prétraitements des échantillons à analyser ce qui la rend plus adaptée pour une utilisation rapide et routinière. La SPR est devenue un outil incontournable pour l'étude des interactions entre molécules. Elle est aujourd'hui utilisée dans plusieurs domaines tels que les études cliniques (ex :

le ciblage de molécules thérapeutiques), la sécurité alimentaire ou encore l'environnement (Shankaran, Gobi, & Miura, 2007). Cette technique a par exemple permis d'étudier l'influence de la qualité des anticorps sur leur interaction avec leurs récepteurs (Dakshinamurthy et al., 2017; Dorion-Thibaut et al., 2014). Dans une autre étude, Chavanne et ses collaborateurs (2008) ont connecté un bioréacteur à un biosenseur SPR pour le suivi, en temps quasi-réel, de la bioactivité d'un anticorps monoclonal se liant à l'antigène prostatique spécifique membranaire (PSMA). Le surnageant de culture issu du bioréacteur fut filtré par filtration tangentielle avant d'être analysé par un biosenseur Biacore 3000. Cette stratégie a permis le suivi de l'évolution de la bioactivité de l'anticorps au cours de culture par l'analyse de son interaction avec PSMA (Chavane, Jacquemart, Hoemann, Jolicoeur, & De Crescenzo, 2008). Cependant, cette méthode d'évaluation de la qualité devrait être considérée avec quelques réserves. En effet, la bioactivité mesurée par SPR en étudiant l'interaction entre une protéine et son récepteur pourrait s'avérer très différente de celle observée *in-vivo*. De plus, cette approche ne permet pas de détecter la présence éventuelle d'isoformes potentiellement immunogènes de la protéine. Pour ces raisons, il peut-être plus intéressant d'évaluer des caractéristiques structurales de la protéine comme par exemple le profil de glycosylation pour évaluer la qualité de la protéine thérapeutique recombinante.

### **2.5.3.1 La résonance plasmonique de surface associée aux lectines.**

L'association des lectines avec la résonance plasmonique de surface fournit un outil permettant de sonder les glycoprotéines dans le but de déterminer leur glycosylation. Par exemple, en utilisant un panel de 6 lectines différentes, Safina et ses collaborateurs (2011) ont démontré qu'il est possible de faire la distinction entre deux mêmes protéines présentant un profil de glycosylation différent mais très proche (ex : la fetuin et l'asialofetuin). Dans cette étude, les glycoprotéines ont été injectées sur la surface SPR contenant des lectines préalablement immobilisées (Safina, Duran, Alasel, & Danielsson, 2011). Dans une étude similaire mais dans laquelle c'est la glycoprotéine qui fut immobilisée, il fut également possible de différencier une même protéine présentant des profils de glycosylation qui diffèrent seulement d'un glycan (Okazaki, Hasegawa, Shinohara, Kamasaki, & Bhikhabhai, 1995). Cependant, il est important de noter que la dynamique d'interaction peut être très différente en fonction du choix du partenaire immobilisé, ce qui peut mener à des inconsistances dans les cinétiques mesurées. De plus, comme la plupart des lectines peuvent avoir plus d'un site de liaison aux glycans, l'affinité apparente observable lors d'une



analyse SPR peut être le résultat d'une interaction réalisée au travers de plusieurs liaisons. C'est le phénomène d'avidité. Celui-ci peut, par exemple, faire varier les constantes cinétiques de l'interaction lectin-glycan ( $K_a$ ) d'un facteur 10,000 en réduisant significativement la constante de dissociation  $k_{diss}$  (Shinohara, Hasegawa, Kaku, & Shibuya, 1997). En outre, la présence du glycan cible en grand nombre augmente également de manière importante l'affinité de la lectine pour la structure glycanée (Lundquist & Toone, 2002). C'est l'effet « *cluster* ». Enfin, pour le choix du partenaire d'immobilisation, les systèmes avec la lectine immobilisée sur la surface SPR sont généralement les plus reproductibles et fournissent les meilleurs résultats lors des mesures de l'affinité (Hirabayashi, 2014).

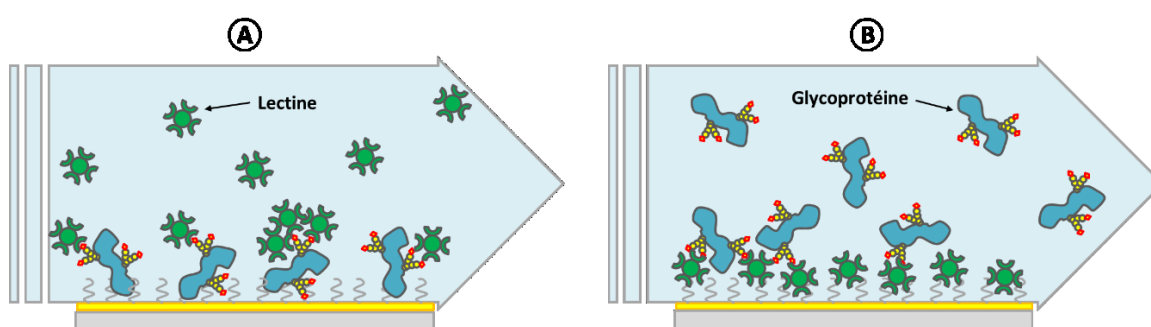


Figure 2.8: Détection de la glycosylation des protéines par résonance plasmonique de surface en exploitant l'affinité des lectines. Configuration dans laquelle les glycoprotéines sont immobilisées (A) et configuration dans laquelle les lectines sont immobilisées (B).

La SPR associée aux lectines peut également servir à analyser la qualité d'une glycoprotéine présente dans un mélange de protéines et de molécules diverses; comme c'est par exemple le cas dans un surnageant de culture. Il s'agit d'une caractéristique très intéressante puisque la plupart des techniques actuelles requièrent de passer par des étapes de purification et/ou de modification chimique de la protéine. Cependant, cette analyse à partir d'un mélange complexe de protéines nécessite deux étapes : une étape de capture de la glycoprotéine d'intérêt à partir du mélange et ensuite l'analyse de la glycosylation à l'aide de lectines. La première étape, qui représente une sorte de purification *in situ*, doit permettre de retenir la glycoprotéine avec une relativement bonne intensité pour limiter la dissociation. Cela peut être réalisé à l'aide d'un anticorps spécifique à la glycoprotéine d'intérêt. Cette stratégie a été utilisée pour étudier le profil de glycosylation d'une protéine présente dans le plasma sanguin afin de détecter des marqueurs du cancer de la prostate (Kazuno et al., 2011). La glycoprotéine d'intérêt, l'haptoglobine, a été capturée à partir du serum

à l'aide d'un anticorps anti-haptoglobine puis sondée à l'aide de lectines, ce qui a permis de corréler le niveau de sialylation à la pathologie. L'absence d'étape de purification, de modification chimique ou encore d'étiquetage de l'échantillon rend cette méthode très prometteuse pour le développement d'une technique de suivi de la glycosylation en cours de culture. À cette fin, une investigation sur l'utilisation de la SPR associée aux lectines pour l'analyse de la glycosylation d'une protéine recombinante à partir du surnageant a été réalisé (voir l'annexe A).

### CHAPITRE 3 PRÉSENTATION DU TRAVAIL ET DÉMARCHE DU PROJET.

Les travaux présentés dans le CHAPITRE 4 ont été publiés dans la revue scientifique *Journal of Biotechnology*. Ils correspondent à la première étape de la thèse dans laquelle nous avons évalué l'influence de la surexpression du gène PYC2 dans la lignée HEK293 sur la qualité d'une glycoprotéine thérapeutique modèle, l'interféron  $\alpha 2b$ . Cette modification qui améliore grandement le métabolisme du glucose s'est avérée également avantageuse pour la qualité. En effet, en combinant plusieurs techniques d'analyse de la glycosylation (électrophorèse sur gel, résonance plasmonique de surface et spectrométrie de masse), nous avons démontré qu'en plus de présenter une moindre accumulation de métabolites toxiques, les cultures de cellules PYC2 maintiennent une meilleure viabilité, ce qui a eu un impact bénéfique sur la qualité de l'interféron  $\alpha 2b$ .

Ensuite, dans le CHAPITRE 5, nous avons combiné le phénotype avantageux des cellules PYC2 avec des stratégies de substitution de la glutamine dans le but de réduire simultanément l'accumulation de lactate et d'ammonium. Ce dernier, qui représente un inhibiteur important de la glycosylation des protéines, s'accumule autant dans les cultures des cellules PYC2 que dans les cultures des cellules parentales. Parmi les stratégies testées, le remplacement de la glutamine par le pyruvate s'est avéré très bénéfique pour la croissance et la production dans les cultures des deux lignées. De plus, nous avons démontré que l'ajout de précurseurs de la glycosylation et d'un cofacteur permet de moduler la glycosylation de l'interféron  $\alpha 2b$  produit par les cellules PYC2 permettant ainsi d'allier l'augmentation des titres en protéine à haute qualité. Ces travaux ont fait l'objet d'un article soumis pour publication dans le journal scientifique *Applied Microbiology and Biotechnology*.

Enfin, dans le CHAPITRE 6, nous avons réalisé en mode cuvée-alimentée (*fed-batch*), des cultures des cellules PYC2 dans un environnement dépourvu de glutamine en utilisant un milieu nutritif concentré. L'objectif étant d'éliminer l'accumulation d'ammonium pour ainsi favoriser la production et surtout la glycosylation de l'interféron  $\alpha 2b$ . En flacons, les cultures en mode *fed-batch* des cellules PYC2 en conditions sans glutamine ont doublé la production en interféron  $\alpha 2b$  sans influence significative sur la croissance par comparaison aux cultures avec glutamine. Cette stratégie a été transposée avec succès en bioréacteur et a démontré une réduction drastique de

l'accumulation du lactate et de l'ammonium. Cette réduction en métabolites toxiques a eu pour conséquence une amélioration de la production et le maintien d'une haute qualité d'interféron  $\alpha 2b$ .

Ces travaux ont fait l'objet d'un article soumis pour publication dans le journal scientifique *Biotechnology Journal*.

## CHAPITRE 4      ARTICLE 1: ALTERING THE CENTRAL CARBON METABOLISM OF HEK293 CELLS: IMPACT ON RECOMBINANT GLYCOPROTEIN QUALITY

Eric Karengera, Anna Robotham, John Kelly, Yves Durocher, Gregory De Crescenzo and Olivier Henry

### 4.1 Présentation de l'article.

Ce CHAPITRE présente l'article intitulé « *Altering the central carbon metabolism of HEK293 cells: Impact on recombinant glycoprotein quality* ». Cet article a été publié dans la revue *Journal Of Biotechnology*.

Les lignées de cellules de mammifère généralement utilisées pour la production de protéines thérapeutiques recombinantes sont caractérisées par une métabolisation inefficace du glucose donnant lieu à une grande accumulation de lactate en cours de culture. Ce lactate est un inhibiteur bien connu de la croissance cellulaire et de la production protéique. La surexpression du gène PYC2 dans les cellules de mammifère améliore grandement le métabolisme du glucose et réduit significativement l'accumulation de lactate (Henry & Durocher, 2011; Irani, Noushin et al., 1999). Cependant, bien que son effet bénéfique sur la croissance et la production volumétrique des cultures ne reste plus à démontrer, son effet sur les attributs de qualité des glycoprotéines produites restait à ce jour encore inconnu.

Peu de connaissances sont disponibles actuellement concernant l'influence d'une altération du métabolisme central du carbone sur la glycosylation. Il est par contre bien reconnu que le maintien du glucose en faible concentration ou son remplacement par des substituts plus lents à métaboliser réduit grandement l'accumulation de lactate, stimulant ainsi la croissance et la production de protéines. Néanmoins, cette stratégie limite la disponibilité du glucose pour la glycosylation. À cet égard, le métabolisme PYC2 permet de fournir suffisamment de glucose aux cellules tout en s'affranchissant du problème du lactate. Cependant, comme le lien entre le métabolisme du carbone et la glycosylation est complexe, il est nécessaire, dans un premier temps, d'évaluer l'impact de la modification PYC2 sur la qualité de la glycoprotéine recombinante. En combinant plusieurs techniques d'analyse de la glycosylation, nous avons démontré qu'en

réduisant l'accumulation des métabolites toxiques, la surexpression du gène PYC2 dans la lignée cellulaire HEK293 mène à des conditions de culture plus favorables à une bonne viabilité cellulaire, ce qui a un impact bénéfique sur la qualité de la protéine recombinante. Cela démontre que les cellules PYC2 présentent un phénotype avantageux pour la production de glycoprotéines recombinantes.

## **4.2 Altering the central carbon metabolism of HEK293 cells: Impact on recombinant glycoprotein quality.**

**Eric Karengera<sup>a</sup>, Anna Robotham<sup>b</sup>, John Kelly<sup>b</sup>, Yves Durocher<sup>c</sup>, Gregory De Crescenzo<sup>a</sup> and Olivier Henry<sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup> Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montréal (QC), Canada H3C 3A7

<sup>b</sup> Human Health Therapeutics Portfolio, National Research Council Canada, Ottawa, Canada

<sup>c</sup> Human Health Therapeutics Portfolio, National Research Council Canada, Montréal, Canada

\*Corresponding author: Olivier Henry at Chemical Engineering Department of École Polytechnique de Montréal, C.P. 6079, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3A7. Tel.: +1 514 340 4711 2191; fax: +1 514 340 4159.

E-mail address: [olivier.henry@polymtl.ca](mailto:olivier.henry@polymtl.ca)

### 4.2.1 Abstract

The accumulation of metabolic by-products remains a critical challenge in the development of mammalian cells culture processes as it impacts cellular growth, productivity and product quality. Although the overexpression of the PYC2 gene was shown to significantly improve the nutrient metabolism efficiency of mammalian cells, its impact on recombinant protein quality has not been investigated yet. In this study, we assess the effect of this metabolic engineering strategy on the quality of a recombinant therapeutic glycoprotein, the human interferon  $\alpha 2b$  (IFN $\alpha 2b$ ). As inferred from densitometry analysis of SDS-PAGE gels, PYC2-overexpressing cells sustained a higher percentage of intact glycosylated IFN $\alpha 2b$  at the late stage of batch cultures, which was correlated with prolonged viability and reduced accumulation of waste metabolites. Contrarily to the IFN $\alpha 2b$  produced by the PYC2 cells, LC-MS analysis confirmed the presence of less glycosylated IFN $\alpha 2b$  as well as the occurrence of proteolytic cleavage in the IFN $\alpha 2b$  produced in the parental cells. Taken together, these results indicate that PYC2-overexpression in mammalian cells leads to extended favorable conditions for glycosylation and offer an attractive approach to mass-produce high-quality recombinant proteins.

**Keywords:** Protein quality, HEK293 cells, PYC2-overexpression, O-glycosylation

### 4.2.2 Introduction

Although cell culture process development has traditionally primarily focused on increasing protein titer, ensuring consistent and high protein quality is now an essential aspect in the establishment of a biomanufacturing process. Protein glycosylation is considered a critical quality attribute because of its significant effects on the *in vivo* efficacy and the half-life of biotherapeutics (Sinclair & Elliott, 2005). The glycan moieties displayed by glycoproteins are involved in several of its properties such as the bio-activity, the molecular integrity of the proteins and in the resistance to the denaturing conditions that may be encountered *in vitro* and *in vivo* (Solá & Griebenow, 2009). Sialylation, the process by which a sialic acid (mainly N-acetylneuraminic acid: NANA or N-glycolylneuraminic acid: NGNA) is added to a terminal galactose or N-acetylgalactosamine (GalNAc) residue on the N- or O- glycan structure, has been demonstrated to play a major role in glycoprotein half-life in the circulatory system. Non-sialylated glycoproteins can be detected by the asialoglycoprotein receptor expressed by some cells, such as the hepatocytes, and then cleared from the circulation (Ashwell & Harford, 1982; Morell et al., 1971). The mechanism of glycosylation and sialylation are affected by several factors, including the producer cell line, the nature of the expressed protein and the cell culture conditions (Hossler et al., 2009). Different types of sialic acid can be used as substrates for sialylation depending on the cell line and the composition of the culture media. CHO cell lines, the most frequently used mammalian cell line for the production of therapeutic protein in industry, use predominantly NANA as substrate for sialylation and to a lesser extent NGNA. NGNA is found in several sialylated mammalian endogenous proteins, but is absent in humans where NANA is most common. Unfortunately, NGNA has been shown to be immunogenic in humans (Ghaderi et al., 2010; Noguchi et al., 1995). Additionally, the sialic acid linkage on terminal galactose or GalNAc may differ between CHO cells and human. While human cells can link sialic acid in  $\alpha 2,3$ - or  $\alpha 2,6$ -linkage, the latter is absent in CHO cell lines. For these reasons, it may be interesting to manufacture glycoproteins in human producer cell lines (Swiech, Picanco-Castro, & Covas, 2012) or to use CHO cell lines engineered to perform human-like sialylation (Raymond et al., 2015).

To improve recombinant protein titer, typical *fed-batch* strategies consist in maintaining low but non-limiting glucose and glutamine concentrations to reduce by-products accumulation in the culture environment. These strategies generally improve the nutrient utilization efficiency of



mammalian cells, yielding better cellular growth or enhanced specific protein productivity (Chee Fung Wong et al., 2005; Gambhir, Europa, & Hu, 1999; Maranga & Goochee, 2006). However, such approach can adversely impact protein quality, since it reduces the availability of nucleotide sugars, the key precursors for N- and O-glycosylations (Chee Fung Wong et al., 2005; Liu, B. et al., 2014; Seo et al., 2014; Villacrés, Tayi, Lattová, Perreault, & Butler, 2015). On the other hand, the use of nutrient-rich media and concentrated feed solutions also present drawbacks as they may be associated with the generation of high amounts of metabolic by-products that can be detrimental to both productivity and protein quality (Andersen, Dana C & Goochee, 1995; Fan et al., 2015). These observations highlight the important role of the central carbon metabolism on protein glycosylation. To tackle this issue, several research groups have turned towards metabolic engineering strategies in order to reduce metabolic waste generation while maintaining sufficient nutrient concentration in culture to support cell growth and to maintain protein quality.

In this regard, the overexpression of the cytosolic yeast pyruvate carboxylase gene (PYC2) in mammalian cells presents advantageous features that can be exploited to improve protein quality attributes. This modification was previously shown to improve cellular growth and final protein titer in *fed-batch* cultures as consequences of a more efficient glucose metabolism (Toussaint, Henry, & Durocher, 2016; Vallée et al., 2014). The PYC2-overexpression strategy has been applied to several industrially relevant mammalian cell lines and has demonstrated, albeit at various degrees, beneficial impacts in terms of nutrient utilization or cellular growth (Elias et al., 2003; Fogolín, Schulz, Wagner, Etcheverrigaray, & Kratje, 2001; Irani, Noushin et al., 1999; Vallée et al., 2014; Wilkens & Gerdtzen, 2015).

Although PYC2 expression in mammalian cells is particularly interesting for the development of high titer *fed-batch* processes (Toussaint et al., 2016; Vallée et al., 2014), its potential beneficial impacts on recombinant protein quality have not yet been investigated. In this work, we specifically studied the effect of the PYC2 metabolism on the quality of the interferon  $\alpha 2b$  (IFN $\alpha 2b$ ) produced by a PYC2-overexpressing HEK293 cell line and its parental cell line. The human IFN $\alpha 2b$  is a therapeutic glycoprotein used for the treatment of viral diseases and several cancers (Brillanti et al., 1994; McHutchison et al., 1998). This glycoprotein is O-glycosylated at one site only (Thr106) and is sialylated (Loignon et al., 2008), making this biotherapeutic an interesting model for the study of the effect of PYC2 metabolism on glycosylation and sialylation.

To this end, batch cultures were performed and the resulting cell kinetics and product characteristics were compared for both the transformed and parental cells.

## 4.2.3 Materials and methods

### 4.2.3.1 Cell lines and culture conditions

The HEK293-D9 clone stably producing the IFN $\alpha$ 2b was derived from the HEK293-6E cell line constitutively expressing an EBNA1 protein of the Epstein-Barr virus, as described by Loignon et al. (2008). The HEK293-F5 clone was generated by transfection of the HEK293-D9 clone with the pCEP5a vector encoding for the yeast pyruvate carboxylase 2 gene (GeneID: 852519; Elias et al., 2003) as previously described by Henry and Durocher (2011).

The cultures were performed in FreeStyle™ F17 Expression Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma) supplemented with 4 mM of glutamine (Sigma–Aldrich, St.Louis, MO), 0.1% anti-clumping agent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma) and 0.1% Pluronic F-68 (Sigma–Aldrich, St.Louis, MO). Batch experiments in shake flasks were performed in duplicate at an initial cell density of  $0.2 \times 10^6$  cells per mL. The initial volume for batch cultures was 30 mL and the flasks were incubated at 37 °C under 5 % CO<sub>2</sub> with agitation at 120 rpm. Cells density was evaluated using a hemocytometer (Reichert, Buffalo, NY) and cell viability was assessed by Trypan blue exclusion. Harvested samples were centrifuged at  $1000 \times g$  for 10 min and the supernatants were stored at –20 °C for subsequent analysis.

### 4.2.3.2 Metabolite analysis and cell-specific rates calculation

Glutamine, glucose and lactate concentration in supernatants were measured with an YSI2700 biochemistry analyzer (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH). VITROS chemistry DT60 II system (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ) was used for ammonia concentration measurements. The cell-specific consumption and production rates were evaluated in the exponential growth phase and calculated using the following equations:

$$q_S = -\frac{\Delta S}{\bar{X}\Delta t} \quad (1)$$

$$q_L = \frac{\Delta L}{\bar{X}\Delta t} \quad (2)$$

Where  $q_S$  is the cell-specific glucose or glutamine consumption rate (pmol/cell.d),  $S$  is the glucose or glutamine concentration (mol/L) and  $\bar{X}$  is the average viable cell density over the time interval  $\Delta t$ . Similarly,  $q_L$  denotes the cell-specific lactate production rate and  $L$  is the lactate concentration.

#### 4.2.3.3 Purification by cation exchange chromatography

IFN $\alpha$ 2b purification was performed with an Äkta Explorer System (GE healthcare, Baie-d'Urfé, QC). 10 mL of cell culture supernatants were loaded at 3 mL/min into a Tricorn<sup>TM</sup> Mono-S 10/100 GL column (GE healthcare, Baie-d'Urfé, QC) equilibrated with 0.1 M Tri-Na citrate buffer, pH 3.5, 0.1 M NaCl. The column was then washed with equilibration buffer at 4 mL/min before eluting with an increasing pH gradient from pH 3.5 to pH 6 in 0.1 M Tri-Na citrate buffer, 0.1 M NaCl for 30 minutes at the same flow rate. The fraction corresponding to IFN $\alpha$ 2b was collected then desalted and buffer-exchanged by filtration using 3-K centrifugal filters (Pall Corporation, Mississauga, ON).

#### 4.2.3.4 Gel electrophoresis and densitometry analysis

30  $\mu$ L of cell culture supernatant, purified sample or commercial standard was mixed with 10  $\mu$ L of 4x Laemmli protein sample buffer (Bio-Rad, Mississauga, ON) containing 10% of  $\beta$ -mercaptoethanol. The samples were then heated at 80 °C for 5 min. After cooling, 25  $\mu$ L of samples were loaded on 4-15% polyacrylamide gel (Bio-Rad, Mississauga, ON). The electrophoresis was performed at 150 V with Tris-glycine pH 8.5, 0.1% SDS as running buffer solution. After migration, the gels were stained with a Coomassie solution for 5 min. The destaining step was first performed in a solution containing 10% of methanol and 10% of acetic acid for 30 minutes then the gel was stored in water overnight.

Densitometry analysis of the SDS-PAGE gels was performed using the ImageJ software (NIH, Bethesda, ML). First, the background correction was applied on the images of the gels (rolling ball radius = 50) then the bands corresponding to IFN $\alpha$ 2b were selected in order to plot the profiles of optical density. Finally, the bands corresponding to the high and low molecular weight fractions of IFN $\alpha$ 2b were selected to compute the band area.

#### 4.2.3.5 Western blot

Without prior normalization of total protein concentration, 25µL of supernatants from the cultures of the PYC2 cells and the parental cells were analyzed by Western-Blot. Following SDS-PAGE, the proteins were transferred to the Immun-Blot® PVDF membranes (Bio-Rad, Mississauga, ON). The membranes were blocked with a mixture of milk, Tris-buffered saline and 0.1% Tween 20. They were then incubated overnight at 4 °C with a rabbit anti-human IFNα2b antibody (PBL Assay Science, Piscataway, NJ) diluted 1:1000 in the incubation solution (Tris-buffered saline solution containing 0.1% Tween 20). After a rinsing step with the incubation solution, the membranes were incubated with a goat anti-rabbit IgG-Peroxidase conjugate (Sigma–Aldrich, St.Louis, MO) diluted 1:50000 in the incubation solution. The chemoluminescent detection was performed with the HRP substrate Immun-Star HRP (Bio-Rad, Mississauga, ON) according to the manufacturer’s recommendations.

#### 4.2.3.6 Sequential IFNα2b digestion with neuraminidase and O-glycosidase

Purified IFNα2b samples harvested at day 7 of the culture were desalted and buffer-exchanged to 50 mM phosphate buffer pH 5.0. 100 µg of IFNα2b was treated with 2 mIU of neuraminidase from *Arthrobacter ureafaciens* (Sigma–Aldrich, St.Louis, MO) for 1 h at 37 °C. This was followed by addition of 5 mU of O-glycosidase from *Diplococcus pneumonia* (Roche, Laval, QC) and incubation at 37 °C for 3 h. For the control samples, 50 mM sodium phosphate, pH 6 was added instead of glycosidases. Migration profiles on SDS-PAGE of non-treated, desialylated and de-O-glycosylated IFNα2b were compared with the migration of a non-glycosylated IFNα2b standard from *E. coli* (Abcam, Toronto, ON).

#### 4.2.3.7 Interferon α2b concentration and sialylation assessment using surface plasmon resonance

IFNα2b concentration was assayed from culture harvests by surface plasmon resonance using a Biacore 3000 biosensor (GE healthcare, Baie-d’Urfé, QC). A monoclonal anti-IFNα2b antibody (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma) was immobilized by the standard amine coupling procedure on a CM5 chip. Briefly, the sensor chip surface was activated by injecting a solution containing a mixture of 100 mM N-hydroxysuccinimide and 400 mM 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride in equal volume for 7 min at a flow rate of 5

$\mu\text{L}/\text{min}$ . This was followed by the injection of the anti-IFN $\alpha$ 2b antibody at a concentration of 50 mg/L in acetate buffer 10 mM pH 5.0 for 10 min. For the reference surface, the same procedure was followed using anti-VEGF antibody (R&D systems, Minneapolis, MN) as a non-specific control antibody. Surfaces were blocked using ethanolamine 1 M, pH 8.0. For the analyses, standard concentrations of IFN $\alpha$ 2b or culture supernatants were injected on the surfaces at a flow rate of 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  for 1 min. This capture phase was followed by 6 min of dissociation phase. The response unit (RU) at the end of this dissociation phase was considered for the IFN $\alpha$ 2b signal for the analyses. The surfaces were regenerated by short injections (10 s) of 50 mM of HCl. A calibration curve was constructed by injecting serial dilution of standard concentrations of IFN $\alpha$ 2b.

By exploiting lectins affinity for specific glycans, surface plasmon resonance biosensing has proved an effective approach for glycoprotein analysis (Safina et al., 2011; Shinohara & Furukawa, 2014). To allow a semi-quantitative assessment of IFN $\alpha$ 2b sialylation, *Sambucus nigra* lectin (SNA) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) at 15 mg/L in acetate buffer 10 mM pH 5 was immobilized on a CM5 chip using the same procedure as aforementioned. SNA is one of the most widely used lectins for sialylation analysis because of its relatively good specificity. According to the manufacturer, this lectin is specific to sialic acid attached to a galactose in  $\alpha$ 2,6- and to a lesser degree in  $\alpha$ 2,3-linkage. Fetuin from fetal bovine serum (Sigma–Aldrich, Oakville, ON) was chosen as a standard sialoglycoprotein (stated by the manufacturer to contain approximately 8% by weight of bound sialic acid) to assess the capacity of the lectin to bind to sialic acid. The SPR sensorgrams showing the interactions between the SNA lectin and IFN $\alpha$ 2b were normalized to allow a direct comparison between the proteins from the two cell lines.

#### 4.2.3.8 Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis

For mass spectrometry analysis, batch cultures of HEK293-F5 (PYC2) and HEK293-D9 were performed and the IFN $\alpha$ 2b was purified using the Äkta Explorer System (GE healthcare, Baie-d’Urfé, QC) from 10 mL of supernatant harvested at day 7. The purified samples were concentrated and desalted by filtration using 3-K centrifugal filters (Pall Corporation, Mississauga, ON). 5  $\mu\text{g}$  of purified samples were loaded on a Poros R2 column at 3 mL/min using the following gradient: 0-3 min 20% solvent B (100% acetonitrile), 3-6 min ramping solvent B 20-90%, 6-7 min decreasing solvent B 90-20% and 7-9min solvent B 20%. Solvent A was 0.1% formic acid in ddH<sub>2</sub>O. The effluents were analyzed by LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Waltham,

Ma) with the ions scanned at a mass resolution of 7500 over the mass range  $m/z$  500-4000. The molecular weight profile of the protein was generated from the mass spectra using MaxEnt (Waters Corporation, Milford, MA). Proteolytic cleavage products were identified by comparing the obtained masses from MS result with the theoretical molecular mass of intact IFN $\alpha$ 2b protein and associated glycan structures.

## 4.2.4 Results

### 4.2.4.1 Cell kinetics

Batch cultures in shake flasks were performed in order to compare the growth kinetics and product characteristics of a PYC2 modified cell line (HEK293-F5) and its parental cell line (HEK293-D9). In these cultures, PYC2-overexpressing cells demonstrated a 50% increase in maximal viable cell density and sustained a high viability (above 95%) until day 7 (Figure 4.1). The parental cell culture viability started to decrease at day 5 and dropped to 60% at the day of culture harvest while PYC2-cells culture viability stayed above 90% till harvest.

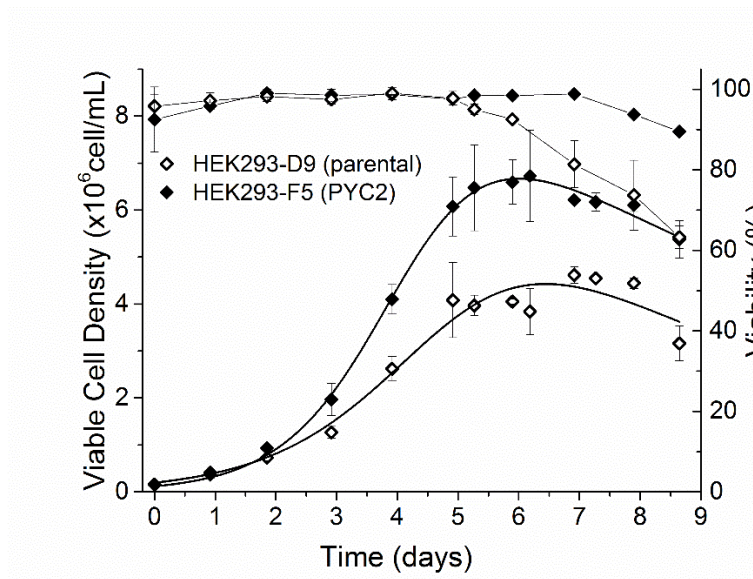


Figure 4.1 :Viable cell density and viability profiles of PYC2-overexpressing HEK293 and the parental cells. Error bars represent the standard deviation between duplicate cultures.

As reported in Table 4.1 , PYC2-overexpression improved the nutrient utilization efficiency, as it led to reductions in cell specific glucose ( $q_{GLC}$ ) and glutamine ( $q_{GLN}$ ) consumption rates by a factor of 1.3 and 1.8, respectively.

Table 4.1 : Metabolic rates measured in the exponential growth phase of batch cultures of HEK293-D9 (parental cells) and HEK293-F5 (PYC2-overexpressing cells).

| <b>Rates<br/>(pmol/cell.d)</b> | <b>HEK293-D9<br/>(parental)</b> | <b>HEK293-F5<br/>(PYC2)</b> | <b>Improvement factor</b> |
|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| $q_{\text{GLC}}$               | $7.0 \pm 0.5$                   | $5.2 \pm 0.4$               | $1.3 \pm 0.1$             |
| $q_{\text{LAC}}$               | $7.1 \pm 0.5$                   | $3.9 \pm 0.3$               | $1.8 \pm 0.2$             |
| $q_{\text{GLN}}$               | $0.9 \pm 0.06$                  | $0.5 \pm 0.04$              | $1.8 \pm 0.2$             |
| <b>LAC/GLC ratio</b>           | $1.0 \pm 0.1$                   | $0.7 \pm 0.1$               | $1.4 \pm 0.2$             |

The maximum lactate concentration in the parental cell cultures reached 20 mM, which is twofold the maximum lactate concentration attained in PYC2 cells cultures. A switch to lactate consumption was observed in all the cultures, though it did not occur at the same time for both cell types (Figure 4.2). The switch to lactate consumption occurred first at day 3 for the PYC2 cells, when glucose concentration was still high (around 14 mM) whereas for the parental cells, the switch happened later (at day 5) when glucose concentration reached low levels (almost 5 mM). In the PYC2 cells cultures, lactate was totally depleted in the medium while it decreased to 6 mM at day 8 of the culture for the parental cells. Although lactate accumulation in mammalian cell culture has not been directly linked to a negative impact on recombinant protein glycosylation yet, its concentration has to be kept at a minimum to favour cell growth and productivity.

Ammonia evolved differently along the cultures. Indeed, although the parental cells started to produce ammonia at a higher and sustained specific rate, the final concentrations were the same for both types of cells (Figure 4.2). However, PYC2 cultures achieved much greater cell concentration and therefore lower ammonia production per cell. The higher production of waste metabolites observed in the parental cell culture probably contributed to the early decline of culture viability.

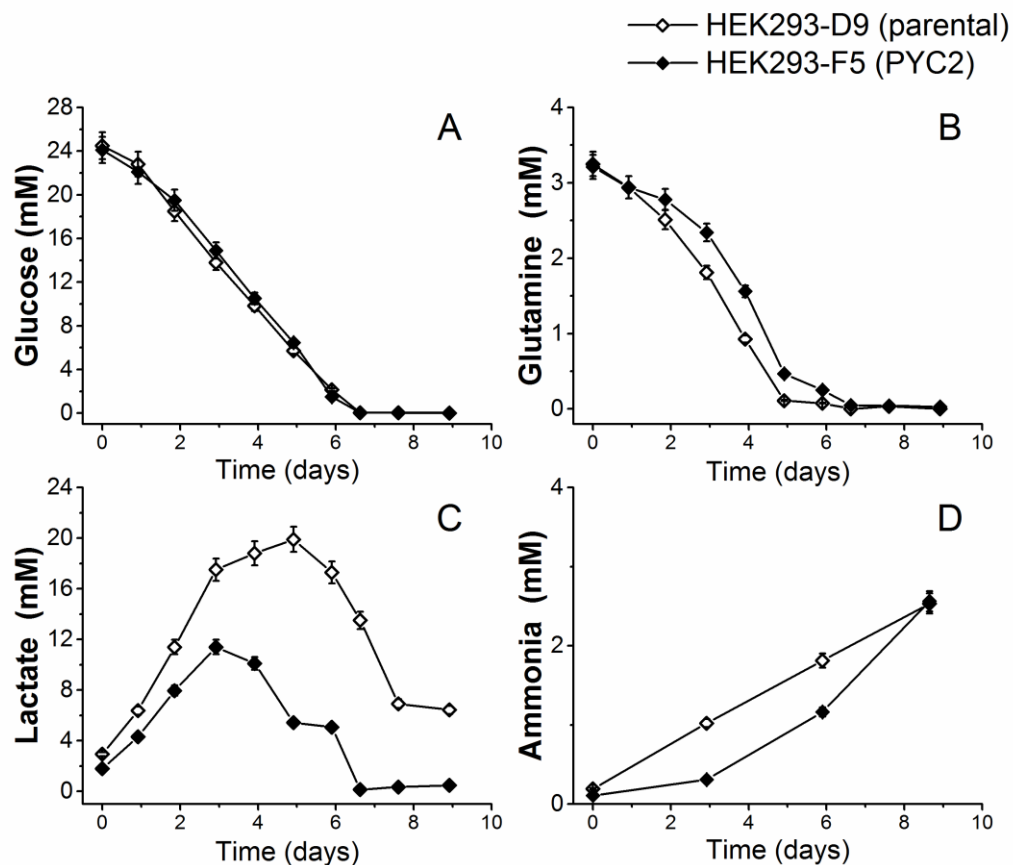


Figure 4.2 : Profiles of the concentrations of glucose (A), glutamine (B), lactate (C) and ammonia (D) in PYC2-overexpressing cells and parental cells cultures.

In summary, PYC2 expression altered significantly the central carbon metabolism of HEK293 cells, leading to sustained cellular growth and higher cell density in cultures. Additionally, PYC2 cells cultures exhibited lower concentrations of lactate and, to a lower extent ammonia, which promoted a high viability for an extended period.

In spite of the observed differences in the nutrient metabolism, the final product titer, as evaluated in an SPR assay, was similar for both parental and PYC2-overexpressing cells with interferon concentrations ranging between 58 to 60 mg/L. Compared to our previous studies with the same cell lines (Henry & Durocher, 2011; Vallée et al., 2014), we achieved similar product yield for the parental cells and slightly higher IFN $\alpha$ 2b concentrations for the PYC2 cell line, most likely due to minor changes in operating conditions and the use of a different method of IFN $\alpha$ 2b quantification (SPR assay vs. ELISA).



#### 4.2.4.2 Protein quality

To study the characteristics of the IFN $\alpha$ 2b produced by the two cell lines in batch culture, the supernatants that had been harvested each day were analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Figure 4.3). For both cell lines, a band corresponding to almost 20 kDa, which is slightly above the expected molecular weight of the IFN $\alpha$ 2b (19 kDa), gradually appeared on the gels from day 1. A minor band of lower molecular weight started to appear in the culture of the parental cells from day 7. As confirmed by Western-Blot analysis of the supernatants harvested from day 6, both bands observed in the parental cells culture corresponded to a low and a high molecular weight fraction of IFN $\alpha$ 2b (Figure 4.4). Moreover, albeit in relatively lower intensity compared to the high molecular weight fraction, this low molecular weight fraction of the protein was also present in the culture of PYC2-overexpressing cells.

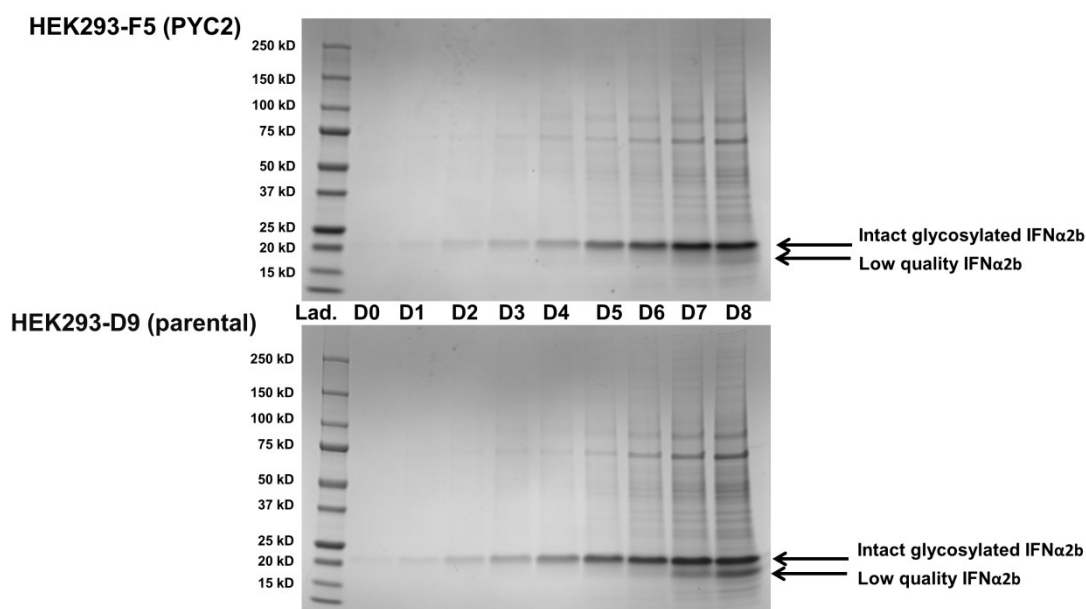


Figure 4.3 : SDS-PAGE analysis of the supernatants from the cultures of PYC2-overexpressing cells and the parental cells. 25 $\mu$ L of clarified supernatant collected daily and mixed with 4x Laemmli sample buffer containing 10% of  $\beta$ -mercaptoethanol was resolved on SDS-PAGE.

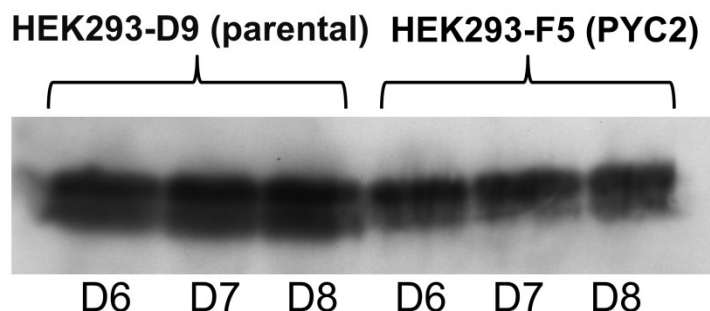


Figure 4.4 : Western Blot analysis of the culture supernatants harvested at days 6, 7 and 8 from the cultures of PYC2-overexpressing cells and the parental cells. No prior normalization of total proteins concentration was performed.

In order to get more insight on the difference in protein quality, sequential digestions with neuraminidase and O-glycosidase were performed on purified IFN $\alpha$ 2b harvested at day 7 from PYC2-overexpressing and parental cell cultures. On that day, cell viability was still above 80% for both cultures. These samples were resolved on SDS-PAGE along with the *E. coli*-derived IFN $\alpha$ 2b standard (Figure 4.5). The electrophoretic mobility of IFN $\alpha$ 2b was increased upon digestion with neuraminidase and with O-glycosidase. As expected, this last digestion produced a band for which the electrophoretic mobility was the same as that of non-glycosylated IFN $\alpha$ 2b standard from *E. coli*. The high molecular weight band that is still visible in the IFN $\alpha$ 2b sample that had been digested with the O-glycosidase most likely represents core 2 type O-glycan, which cannot be efficiently removed by the glycosidase employed. The results thus highly suggest that the minor fraction of IFN $\alpha$ 2b observed in the parental cell cultures may correspond to the non-sialylated portion of the protein and/or proteolytic degradation products. Indeed, as will be discussed later, further analysis indicated that this low molecular weight fraction may be composed of lightly and non-glycosylated IFN $\alpha$ 2b and the protein degraded by proteolytic cleavage.

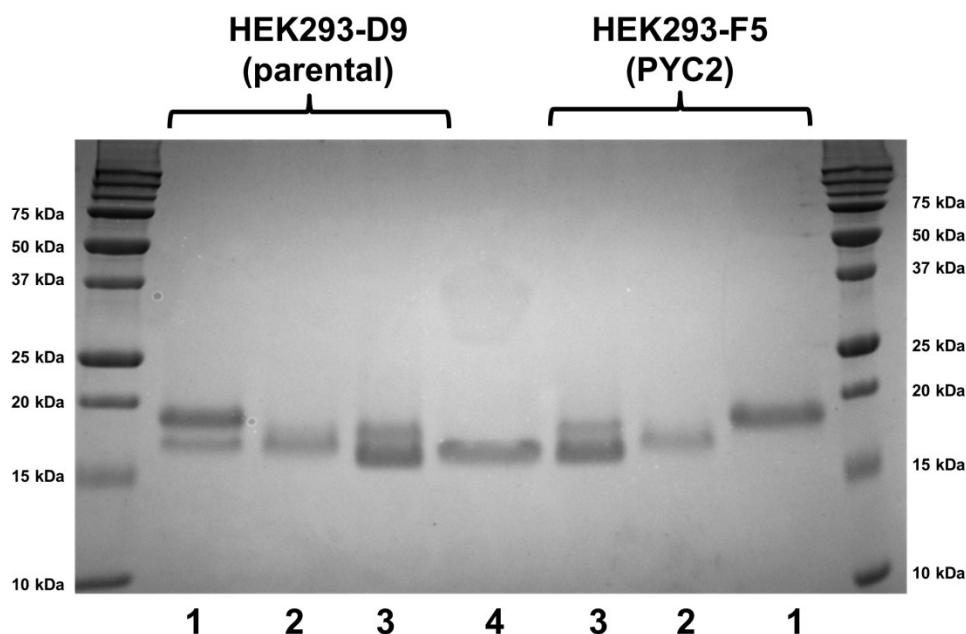


Figure 4.5: Sequential glycosidase digestions of purified IFN $\alpha$ 2b from day 7 of the cultures of PYC2-overexpressing cells and the parental cells. The SDS-PAGE gel was loaded with 2  $\mu$ g of untreated purified IFN $\alpha$ 2b (lane 1), 1  $\mu$ g of purified IFN $\alpha$ 2b digested with neuraminidase (lane2), 2  $\mu$ g of IFN $\alpha$ 2b digested with neuraminidase plus O-glycosidase from *Diplococcus pneumoniae* (lane 3) and 2  $\mu$ g of non-glycosylated IFN $\alpha$ 2b standard from *Escherichia coli* (lane 4).

To get more quantitative information about the relative amounts of intact glycosylated and lower quality IFN $\alpha$ 2b produced in batch cultures by the two cell lines, the SDS-PAGE gels were analyzed by densitometry using the imageJ software (ImageJ, NIH) (Figure 4.6). For both cell lines, the low molecular weight IFN $\alpha$ 2b band was detectable from the third day of culture. A rapid increase of this fraction of IFN $\alpha$ 2b was observed for the parental cell culture while it stood relatively low in the PYC2-overexpressing cells culture. The percentage of intact glycosylated IFN $\alpha$ 2b decreased sharply from day 6 and reached 60% at day 8 for the parental cell culture. This corresponded to the time when glucose concentration reached critically low level in both cultures. In sharp contrast, the percentage of intact glycosylated IFN $\alpha$ 2b in the PYC2 cells cultures linearly decreased down to 87% at day 8.

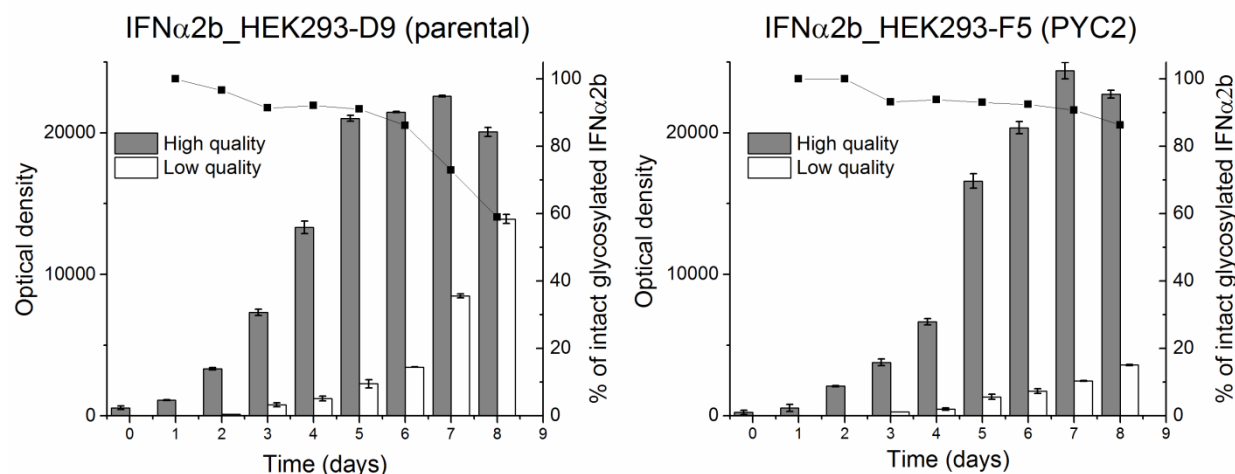


Figure 4.6: Densitometry analysis of SDS-PAGE gels performed using ImageJ software. The bars denote the optical density and the square points show the evolution of the percentage of intact glycosylated IFNα2b.

#### 4.2.4.3 Glycosylation analysis by surface plasmon resonance and mass spectrometry

To infer potential differences in the sialylation state of the proteins produced by the two cell lines, purified samples of IFNα2b collected at harvest were analyzed via an SPR assay to measure the protein interactions with an SNA lectin. It should be noted that the affinity of a lectin toward a specific glycan can be influenced by its linkage but also by the nature of the surrounding glycans (Haseley, Talaga, Kamerling, & Vliegthart, 1999). The human IFNα2b can be sialylated either in α2,6- or in α2,3-linkage (Nyman, Kalkkinen, Tölö, & Helin, 1998). In our SPR assays, considering the specificity of the SNA lectin employed, it was mainly the interaction with α2,6-linked sialic acid that accounted for the SPR signal. Our results demonstrated that the IFNα2b produced by the two cell lines presents different profile of interaction with the immobilized SNA lectin (Figure 4.7). Indeed, while the IFNα2b from the parental cells showed a faster dissociation from the lectin after injection, the IFNα2b from PYC2-cells displayed a lower dissociation rate as evidenced by the significantly higher SPR signal at the end of the dissociation phase. This semi-quantitative SPR assay provided a strong indication that the glycoforms of IFNα2b produced by the two cell clones differ in their sialylation pattern.

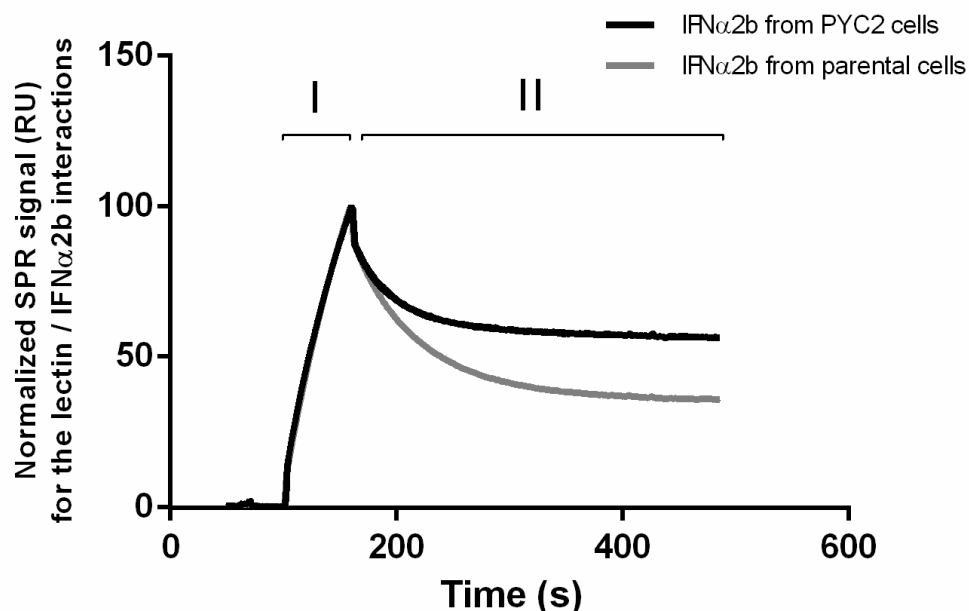


Figure 4.7 : Surface plasmon resonance analysis of the sialylation of IFN $\alpha$ 2b produced by PYC2-overexpressing cells and the parental cells. Purified samples of IFN $\alpha$ 2b were injected on immobilized *Sambucus nigra* (SNA) lectin. The normalized sensorgrams are composed of two distinct regions corresponding to the injection of IFN $\alpha$ 2b over the immobilized SNA lectin (I) and buffer injection resulting in the dissociation of the previously formed IFN $\alpha$ 2b - SNA lectin complexes (II).

In order to get more detailed insights into the IFN $\alpha$ 2b glycoforms found in the proteins produced by the two cell lines, mass spectrometry (MS) analysis of purified samples harvested at day 7 of the batch cultures were performed. It should be noted that the MS spectra shown in Figure 4.8 were normalized, such that the glycoform distributions can be compared on a relative basis. MS spectra indicated that the main fraction of the IFN $\alpha$ 2b produced by both the PYC2-overexpressing and the parental cells is glycosylated with the most abundant glycoform being the mature IFN $\alpha$ 2b peptide chain associated to a core type-1 disialylated O-glycan (Figure 4.8, peaks c and f). The second most abundant mass appears to be composed of the mature IFN $\alpha$ 2b peptide chain containing a core type-2 disialylated O-glycan (peaks d and g), this glycoform possibly being the one the O-glycosidase from *Diplococcus pneumoniae* enzyme failed to remove during the

sequential digestion experiments. These mass spectrometry results are in good agreement with previous glycosylation characterization of IFN $\alpha$ 2b isolated from human leukocytes (Nyman et al., 1998). The spectra also show the occurrence of amino acids loss by proteolytic cleavage of the IFN $\alpha$ 2b peptide chain. More proteolysis events are observed in the case of the parental cell line, suggesting the presence of a higher amount of proteases in the culture environment at day 7. The spectra indicated the loss of residues at the C-terminal end of the protein (serine, lysine and glutamic acid) as well as the loss of a cysteine at the N-terminal end. Hence, there is evidence of non-glycosylated (Figure 4.8, peak a) as well as slightly glycosylated (Figure 4.8, peak b) (the glycosylation site is only occupied by a single sugar, N-acetylgalactosamine) interferon among the IFN $\alpha$ 2b produced by the parental cells. The IFN $\alpha$ 2b produced by the parental cells was previously characterized by Loignon et al. (2008) and we observed the same most abundant glycoforms, namely the two types of disialylated glycans. There were also minor differences in the type-1 monosialylated O-glycan which, despite being present in the study of Loignon et al. (2008), was not observed in the IFN $\alpha$ 2b produced by the parental cells in our study. Moreover, unlike our results, they did not observe any significant signs of proteolytic degradation or the presence of non-glycosylated IFN $\alpha$ 2b, most probably due to the fact that the samples were collected earlier during the culture, when cell viability was still relatively high. From the gel electrophoresis analyses of our cultures, one could have expected higher peak intensity corresponding to non-glycosylated IFN $\alpha$ 2b. However, the MS results rather imply that the low molecular weight band of IFN $\alpha$ 2b observed during gel electrophoresis analyses may be mainly composed of IFN $\alpha$ 2b truncated by proteolytic cleavage and, to a lesser extent, non-glycosylated and partially glycosylated fractions of the protein. While no evidence of non-glycosylated IFN $\alpha$ 2b was detected in the interferon produced by the PYC2-overexpressing cells, a lower fraction of the protein is associated to a core type-1 monosialylated O-glycan. The latter glycoform is not found in the interferon produced by the parental cells.

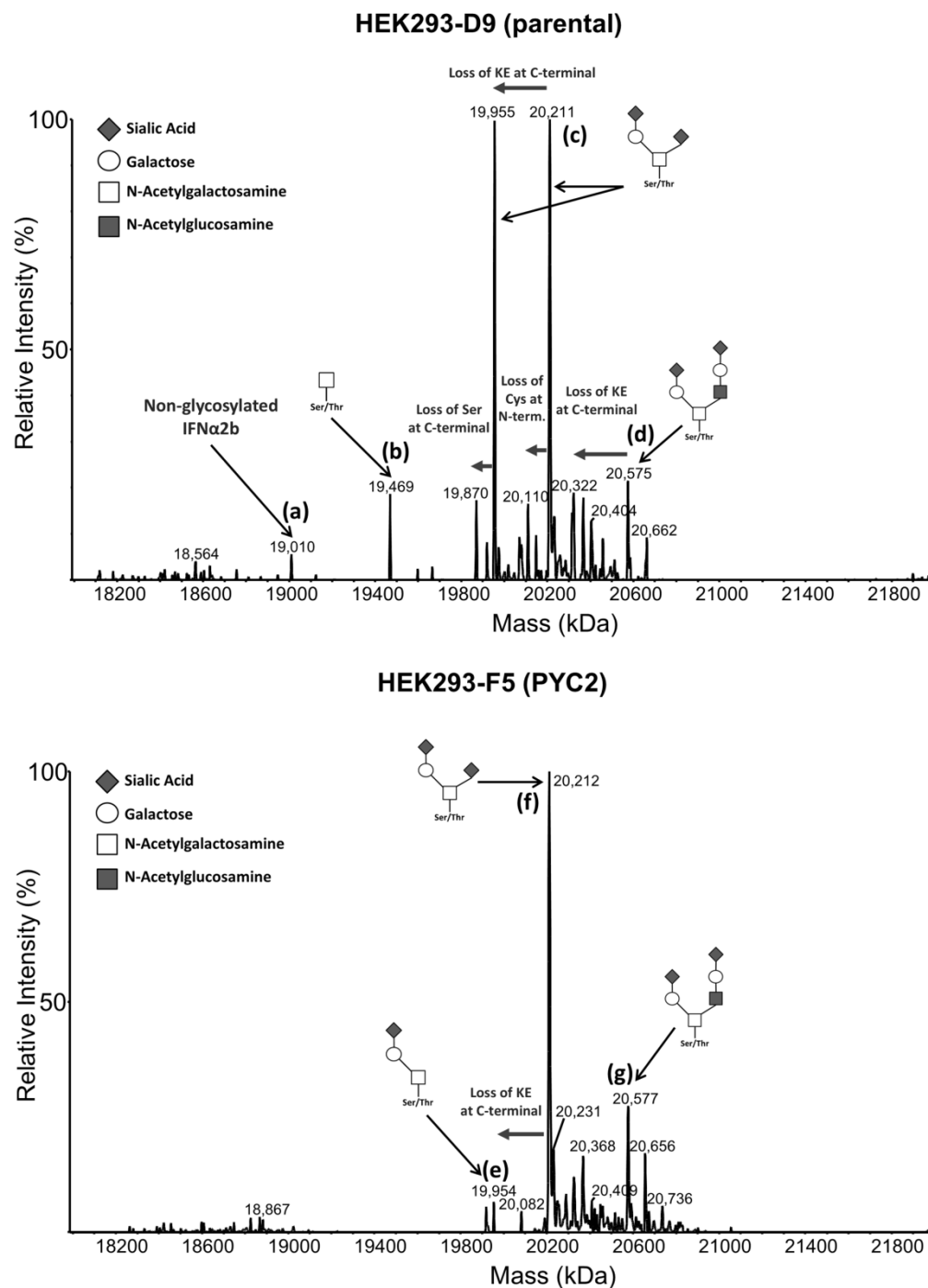


Figure 4.8 : LC-MS analysis of the IFN $\alpha$ 2b produced by PYC2-overexpressing cells and the parental cells. Purified samples of IFN $\alpha$ 2b harvested at day 7 were analyzed. Thick arrows indicate the loss of amino acids at the designated terminal ends of IFN $\alpha$ 2b.

Generally, recombinant protein glycosylation and sialylation have been shown to decrease during the late phase of batch cultures due to several factors such as the depletion in key nutrients, the accumulation of metabolic waste and changes in the metabolic state of the cells (Burleigh et al., 2011; Chuan et al., 2006; Gu, Harmon, & Wang, 1997; Yang, M. & Butler, 2000). Additionally, the decrease of culture viability is known to be responsible for the release of extracellular glycosidases and proteases that may alter the glycosylation and the integrity of the glycoproteins present in the media (Gramer & Goochee, 1993; Hansen, K., Kjalke, Rasmussen, Kongerslev, & Ezban, 1997). In this regard, even though a direct effect of lactate on glycosylation has not yet been demonstrated, this metabolic waste is a well-known inhibitor of culture viability.

#### 4.2.5 Discussion

Glucose is an essential nutrient in mammalian cell culture. Immortalized cell lines are characterized by an inefficient glucose metabolism as the main fraction of the glucose consumed is converted into lactate thereby generating less energy than if it was further oxidized in the tricarboxylic acid (TCA) cycle. In addition, lactate accumulation is a well-known inhibitory factor of cell growth and productivity and limits the performance of fed-batch cultures (Cruz, H. J., Freitas, C. M., Alves, P. M., Moreira, J. L., & Carrondo, M. J. T., 2000; Omasa, Higashiyama, Shioya, & Suga, 1992). Maintaining low glucose concentration is known to significantly improve its utilization efficiency in culture, leading to low lactate accumulation that generally translates into better cellular growth and higher protein titer. Unfortunately, this strategy may be detrimental to protein quality as suggested by several studies (Liu, B. et al., 2014; Liu, B., Villacres-Barragan, Lattova, Spearman, & Butler, 2013; Villacrés et al., 2015). We here have investigated the potential of the PYC2-overexpressing HEK293 cells to produce highly glycosylated recombinant proteins by characterizing the quality of the interferon  $\alpha 2b$  produced in batch cultures.

According to the model of Irani et al. (1999), the cytosolic PYC2 enzyme allows to dispatch the pyruvate produced from the glycolysis towards the formation of oxaloacetate thereby reducing its availability for lactate production. In the cytosol, the oxaloacetate can be converted into malate by the malate dehydrogenase enzyme. The latter can be channeled to the mitochondria through the malate/aspartate shuttle and contribute to energy generation in the TCA cycle (Irani, Noushin et al., 1999). In our batch cultures, PYC2-overexpressing HEK293 cells were characterized by a twofold higher growth rate and a 50% increase in maximum cell density by comparison to the



parental cells. This is in agreement with previous studies that observed at various degrees the same beneficial impact of this genetic modification (Henry & Durocher, 2011; Toussaint et al., 2016; Vallée et al., 2014). However, no significant difference has been observed in term of final protein titer, indicating a decrease of the average cell specific productivity. In the literature, contrasted observations have been made in term of recombinant protein cell specific productivity. Indeed, depending on the cell type and the culture conditions, the cell specific productivity is either increased (Fogolin et al., 2004), diminished (Wilkens & Gerdtzen, 2015) or unchanged by the PYC2 gene overexpression (Elias et al., 2003; Henry & Durocher, 2011). Recently, Wilkens et al. (2015) proposed that the decline in specific productivity may be due to a change in the redox state that turns out to be detrimental to the assembly of proteins made of several polypeptides chains (Wilkens & Gerdtzen, 2015). However, the IFN $\alpha$ 2b is translated as a single polypeptide chain and still we observed a detrimental effect of the PYC on the cell specific productivity, suggesting that a more complex underlying mechanism may be involved.

To reduce potential harmful effects to the patient and increase drug efficacy, therapeutic glycoproteins are preferentially produced in mammalian cells so as to ensure that the protein undergoes the appropriate post-translational modifications. While a vast majority of commercially available biotherapeutics are produced in CHO cells, the use of human cells lines such as HEK293 can be of particular interest for the production of glycoproteins particularly in an effort to reduce the occurrence of immunogenic glycan structures. Indeed, although CHO cells are well recognized by regulatory authorities, they have the potential to produce potentially immunogenic glycosylation pattern such as glycans containing  $\alpha$ -Gal and NGNA. However, even when using human cells, one must pay particular attention to the composition of the culture medium since the risk that exogenous glycan precursor, such as NGNA, to be taken up by the cell and incorporated in endogenous glycoproteins exists (Ghaderi et al., 2010; Tangvoranuntakul et al., 2003). Nonetheless, this is unlikely when using chemically defined media since NGNA would generally come from serum or animal-derived peptones.

Glucose concentration is known to directly impact protein quality as it influences the availability of the glycan precursors for glycosylation (Liu, B. et al., 2014). For example, in *fed-batch* culture of the human cell line rF2N78 producing a human IgG, Sin Seok Seo and colleagues (2014) observed that the increase of non-glycosylated antibody at the end of a culture without glucose feeding was not due to a deficiency in the expression of glycosylation enzymes but rather

to insufficient precursor for glycosylation (Seo et al., 2014). Indeed, low glucose concentration leads to reduced intracellular concentration of UDP-GlcNAc and UDP-GalNAc (Fan et al., 2015; Villacrés et al., 2015). In our study, glucose depleted virtually at the same time of the culture and yet we observed a delayed production of IFN $\alpha$ 2b of lower quality between the two types of cells thus suggesting an effect linked to the difference in the nutrient metabolism.

In addition to the glucose gradual depletion in batch culture, the decrease in culture viability reduces protein quality as it promotes the release of intracellular glycosidases and proteases in the culture environment. The high proteolytic cleavage observed in the cultures of the parental cells can likely be attributed to proteases released from lysed cells, as evidenced by the lower culture viability. By looking at the structure of the interferon  $\alpha$ 2b (Radhakrishnan et al., 1996), one can notice that the C-terminal end of the protein is well exposed to the solvent by comparison to the rest of the peptide chain. This could explain that most of the cleavage events in our cultures involve the loss of residues at the C-terminal end of IFN $\alpha$ 2b. In addition to the fact that several glycoforms of IFN $\alpha$ 2b corresponded to a cleaved peptide chain, non-sialylated glycoforms were also observed in the culture of the parental cells. Xuejun Gu and colleagues (1996) made the observation that the decrease in interferon  $\gamma$  sialylation was concomitant with the loss of cell viability and could be prevented by using sialidase inhibitor (Gu et al., 1997). Chuan et al. (2006) correlated the decline in cell viability with several caspase activities and the increase in extracellular sialidase concentration in batch and *fed-batch* cultures of CHO cells stably expressing the erythropoietin (Chuan et al., 2006). Besides, as proposed by Jong Hyun Lee (2015), the overexpression of antiapoptotic proteins such as Bcl-X<sub>L</sub> was shown to extend cell culture viability in such a way to promote high sialylation of the proteins (Lee et al., 2015).

Since it may impact culture viability, lactate accumulation has an indirect effect on protein quality. Although in our study lactate consumption occurred for both cell lines, the highest accumulation of this metabolite was observed in the parental cell cultures. It is thus possible that this lactate build up contributed, at least in part, to the deterioration of the environmental conditions that favoured the drop of the viability in the parental cell cultures. Substituting glucose by a slowly metabolized sugar such as galactose was sometimes shown to be effective at reducing lactate generation and could potentially improve cell culture viability (Altamirano, Claudia, Illanes, Becerra, Cairó, & Gòdia, 2006; Altamirano, C et al., 2000). However, special care should be taken since such change may also alter the glycosylation profile of the recombinant protein. Reducing

the temperature during the production phase is another strategy that was shown to prolong cell viability while maintaining glycoform quality in CHO cell cultures (Ahn, Jeon, Jeong, Lee, & Yoon, 2008; Bollati-Fogolin et al., 2005; Fox, Patel, Yap, & Wang, 2004), but has not proven to be effective with our HEK293 cell lines (data not shown).

As the glucose and glutamine metabolisms are intimately intertwined, we observed that the PYC2 metabolism also alters glutamine utilization. However, while ammonia remained lower in the case of PYC2 cells culture, a quick increase in ammonia production at later stage is observed, in agreement with our previous study (Vallée et al., 2014). This could turn out to be detrimental in glutamine supplied *fed-batch* cultures assuming that this metabolic behavior remains in this culture mode. To tackle this potential drawback, glutamine substitution strategies can be considered. Ammonia has proven detrimental for protein glycosylation even at relatively low concentrations (i.e. 2 mM) (Andersen, Dana C & Goochee, 1995). Yang and Butler (2000) studied the effect of ammonia on the O-glycosylation of EPO produced by CHO cells. In their study, following SDS-PAGE analysis of EPO treated with PNGase-F, densitometry analysis of the gels showed that the ratio of the non-glycosylated to the O-glycosylated EPO increased proportionally with the concentration of ammonia (Yang, M. & Butler, 2000). In our study, although final ammonia concentration did not differ much between the two cell lines, parental cells were characterized by a higher early production rate leading to greater ammonia concentration throughout the cultures. This implies that the effect of ammonia on cell growth and IFN $\alpha$ 2b glycosylation in these cultures was likely more important than in the PYC2 cells, especially during the early and mid-stages of the culture. Several mechanisms of glycosylation inhibition by ammonia have been hypothesized: by increasing the pH of the trans-Golgi compartment, ammonia may inhibit key glycosylation enzymes such as sialyltransferases and galactosyltransferases leading to low glycosylation and sialylation (Andersen, Dana C & Goochee, 1995). In our study, this may explain the presence of non-glycosylated IFN $\alpha$ 2b as well as a faintly glycosylated fraction of IFN $\alpha$ 2b in the parental cell cultures, as illustrated by the protein associated to only a N-acetylgalactosamine glycan (Figure 4.8, peak b). Alternatively, as ammonia is involved in the biosynthesis pathway of glycan precursors, high ammonia level is also thought to increase the level of intracellular UDP-GlcNac and UDP-GalNac, two essential precursor molecules for glycosylation, leading to increased complexity (higher antennary) of glycan structures (Gawlitsek, Valley, & Wagner, 1998; Ryll et

al., 1994). However, to our knowledge, this observation has only been made in the case of N-glycosylation.

In summary, the lower waste metabolite accumulation observed in the cultures with PYC2 cells promoted the maintenance of high cell viability which led to delayed cellular death at the late stage of the cultures. This had a beneficial impact on protein quality as it reduced and postponed the release of intracellular proteases and glycosidases that generally occur upon cell death and lysis. This translated into IFN $\alpha$ 2b with better sialylation and lower proteolytic cleavage.

#### 4.2.6 Conclusion

In order to study the impact of the distinct metabolism displayed by PYC2-expressing cells on recombinant protein quality, valuable information on protein macroheterogeneity could be retrieved from gel electrophoresis analyses of culture supernatants. PYC2-overexpressing cells were showed to sustain a higher fraction of intact glycosylated interferon  $\alpha$ 2b at the late stage of batch cultures by comparison with the parental cells. Surface plasmon resonance technique taking advantage of lectin affinity for glycosylated proteins also suggested differences in the sialylation of the IFN $\alpha$ 2b glycoforms from the two cell lines. LC-MS analysis confirmed these observations and provided additional and complementary information about the occurrence of proteolytic cleavage in the IFN $\alpha$ 2b produced by the parental cells. Taken together, the results indicate that the phenotype of PYC2 cells, by significantly reducing waste metabolite accumulation, has a beneficial impact on culture viability which leads to prolonged favorable conditions for glycosylation resulting in a higher fraction of intact and glycosylated recombinant glycoprotein. Since it alleviates the need to maintain low glucose concentration in order to reduce lactate accumulation, this metabolic engineering strategy represents an interesting and simple approach for the development of *fed-batch* processes producing high-quality recombinant protein using concentrated feed solutions. This would require further investigation since the feeding strategy and the associated changes in culture conditions can all potentially impact product quality.

#### 4.2.7 Acknowledgements

This work was supported by Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies (FRQNT). Eric Karengera received a scholarship from Wallonia-Brussels International (WBI). This is NRC publication #NRC\_HHT53316.

#### 4.2.8 References

- Ahn, W.S., Jeon, J.J., Jeong, Y.R., Lee, S.J., Yoon, S.K., (2008) Effect of culture temperature on erythropoietin production and glycosylation in a perfusion culture of recombinant CHO cells. *Biotechnology and bioengineering* 101, 1234-1244.
- Altamirano, C., Illanes, A., Becerra, S., Cairó, J.J., Gòdia, F., (2006) Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose. *Journal of biotechnology* 125, 547-556.
- Altamirano, C., Paredes, C., Cairo, J., Godia, F., (2000) Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine. *Biotechnology progress* 16, 69-75.
- Andersen, D.C., Goochee, C.F., (1995) The effect of ammonia on the O-linked glycosylation of granulocyte colony-stimulating factor produced by chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and bioengineering* 47, 96-105.
- Ashwell, G., Harford, J., (1982) Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annual review of biochemistry* 51, 531-554.
- Bollati-Fogolin, M., Forno, G., Nimtz, M., Conradt, H.S., Etcheverrigaray, M., Kratje, R., (2005) Temperature Reduction in Cultures of hGM-CSF-expressing CHO Cells: Effect on Productivity and Product Quality. *Biotechnology progress* 21, 17-21.
- Brillanti, S., Garson, J., Foli, M., Whitby, K., Deaville, R., Masci, C., Miglioli, M., Barbara, L., (1994) A pilot study of combination therapy with ribavirin plus interferon alfa for interferon alfa-resistant chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 107, 812-817.
- Burleigh, S.C., van de Laar, T., Stroop, C.J., van Grunsven, W.M., O'Donoghue, N., Rudd, P.M., Davey, G.P., (2011) Synergizing metabolic flux analysis and nucleotide sugar metabolism to understand the control of glycosylation of recombinant protein in CHO cells. *BMC biotechnology* 11, 1.
- Chee Fung Wong, D., Tin Kam Wong, K., Tang Goh, L., Kiat Heng, C., Gek Sim Yap, M., (2005) Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation quality in CHO cell cultures. *Biotechnology and bioengineering* 89, 164-177.

- Chuan, K.H., Lim, S.F., Martin, L., Yun, C.Y., Loh, S.O., Lasne, F., Song, Z., (2006) Caspase activation, sialidase release and changes in sialylation pattern of recombinant human erythropoietin produced by CHO cells in batch and fed-batch cultures. *Cytotechnology* 51, 67-79.
- Cruz, H.J., Freitas, C.M., Alves, P.M., Moreira, J.L., Carrondo, M.J.T., (2000) Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. *Enzyme and Microbial Technology* 27, 43-52.
- Elias, C.B., Carpentier, E., Durocher, Y., Bisson, L., Wagner, R., Kamen, A., (2003) Improving glucose and glutamine metabolism of human HEK 293 and trichoplusiani insect cells engineered to express a cytosolic pyruvate carboxylase enzyme. *Biotechnology progress* 19, 90-97.
- Fan, Y., Jimenez Del Val, I., Müller, C., Wagtberg Sen, J., Rasmussen, S.K., Kontoravdi, C., Weilguny, D., Andersen, M.R., (2015) Amino acid and glucose metabolism in fed-batch CHO cell culture affects antibody production and glycosylation. *Biotechnology and bioengineering* 112, 521-535.
- Fogolin, M.B., Wagner, R., Etcheverrigaray, M., Kratje, R., (2004) Impact of temperature reduction and expression of yeast pyruvate carboxylase on hGM-CSF-producing CHO cells. *Journal of biotechnology* 109, 179-191.
- Fogolin, M.M.B., Schulz, C., Wagner, R., Etcheverrigaray, M., Kratje, R., (2001) Expression of Yeast Pyruvate Carboxylate in hGM-CSF-Producing CHO Cells. *Animal Cell Technology: From Target to Market*. Springer, pp. 241-243.
- Fox, S.R., Patel, U.A., Yap, M.G., Wang, D.I., (2004) Maximizing interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells through temperature shift optimization: experimental and modeling. *Biotechnology and bioengineering* 85, 177-184.
- Gambhir, A., Europa, A.F., Hu, W.-S., (1999) Alteration of cellular metabolism by consecutive fed-batch cultures of mammalian cells. *Journal of bioscience and bioengineering* 87, 805-810.
- Gawlitsek, M., Valley, U., Wagner, R., (1998) Ammonium ion and glucosamine dependent increases of oligosaccharide complexity in recombinant glycoproteins secreted from cultivated BHK-21 cells. *Biotechnology and bioengineering* 57, 518-528.

- Ghaderi, D., Taylor, R.E., Padler-Karavani, V., Diaz, S., Varki, A., (2010) Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins. *Nature biotechnology* 28, 863-867.
- Gramer, M.J., Goochee, C.F., (1993) Glycosidase activities in Chinese hamster ovary cell lysate and cell culture supernatant. *Biotechnology progress* 9, 366-373.
- Gu, X., Harmon, B.J., Wang, D.I., (1997) Site-and branch-specific sialylation of recombinant human interferon-g in Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnology and bioengineering* 55, 390-398.
- Hansen, K., Kjalke, M., Rasmussen, P.B., Kongerslev, L., Ezban, M., (1997) Proteolytic cleavage of recombinant two-chain factor VIII during cell culture production is mediated by protease (s) from lysed cells. The use of pulse labelling directly in production medium. *Cytotechnology* 24, 227-234.
- Haseley, S.R., Talaga, P., Kamerling, J.P., Vliegenthart, J.F., (1999) Characterization of the carbohydrate binding specificity and kinetic parameters of lectins by using surface plasmon resonance. *Analytical biochemistry* 274, 203-210.
- Henry, O., Durocher, Y., (2011) Enhanced glycoprotein production in HEK-293 cells expressing pyruvate carboxylase. *Metabolic engineering* 13, 499-507.
- Hossler, P., Khattak, S.F., Li, Z.J., (2009) Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology* 19, 936-949.
- Irani, N., Wirth, M., van den Heuvel, J., Wagner, R., (1999) Improvement of the primary metabolism of cell cultures by introducing a new cytoplasmic pyruvate carboxylase reaction. *Biotechnology and bioengineering* 66, 238-246.
- Lee, J.H., Kim, Y.G., Lee, G.M., (2015) Effect of Bcl-xL overexpression on sialylation of Fc-fusion protein in recombinant Chinese hamster ovary cell cultures. *Biotechnology progress* 31, 1133-1136.
- Liu, B., Spearman, M., Doering, J., Lattová, E., Perreault, H., Butler, M., (2014) The availability of glucose to CHO cells affects the intracellular lipid-linked oligosaccharide distribution, site occupancy and the N-glycosylation profile of a monoclonal antibody. *Journal of biotechnology* 170, 17-27.

- Liu, B., Villacres-Barragan, C., Lattova, E., Spearman, M., Butler, M., (2013) Differential affects of low glucose on the macroheterogeneity and microheterogeneity of glycosylation in CHO-EG2 camelid monoclonal antibodies. BMC proceedings. BioMed Central, p. 1.
- Loignon, M., Perret, S., Kelly, J., Boulais, D., Cass, B., Bisson, L., Afkhamizarreh, F., Durocher, Y., (2008) Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFN $\alpha$ 2b in HEK293 cells. BMC biotechnology 8, 65.
- Maranga, L., Goochee, C.F., (2006) Metabolism of PER. C6TM cells cultivated under fed-batch conditions at low glucose and glutamine levels. Biotechnology and bioengineering 94, 139-150.
- McHutchison, J.G., Gordon, S.C., Schiff, E.R., Shiffman, M.L., Lee, W.M., Rustgi, V.K., Goodman, Z.D., Ling, M.-H., Cort, S., Albrecht, J.K., (1998) Interferon  $\alpha$ -2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. New England Journal of Medicine 339, 1485-1492.
- Morell, A.G., Gregoriadis, G., Scheinberg, I.H., Hickman, J., Ashwell, G., (1971) The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. Journal of Biological Chemistry 246, 1461-1467.
- Noguchi, A., Mukuria, C.J., Suzuki, E., Naiki, M., (1995) Immunogenicity of N-glycolylneuraminic acid-containing carbohydrate chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells. Journal of biochemistry 117, 59-62.
- Nyman, T.A., Kalkkinen, N., Tölö, H., Helin, J., (1998) Structural characterisation of N-linked and O-linked oligosaccharides derived from interferon- $\alpha$ 2b and interferon- $\alpha$ 14c produced by Sendai-virus-induced human peripheral blood leukocytes. European Journal of Biochemistry 253, 485-493.
- Omasa, T., Higashiyama, K.I., Shioya, S., Suga, K.i., (1992) Effects of lactate concentration on hybridoma culture in lactate-controlled fed-batch operation. Biotechnology and bioengineering 39, 556-564.
- Radhakrishnan, R., Walter, L.J., Hruza, A., Reichert, P., Trotta, P.P., Nagabhushan, T.L., Walter, M.R., (1996) Zinc mediated dimer of human interferon- $\alpha$  2b revealed by X-ray crystallography. Structure 4, 1453-1463.



- Raymond, C., Robotham, A., Spearman, M., Butler, M., Kelly, J., Durocher, Y., (2015) Production of  $\alpha 2$ , 6-sialylated IgG1 in CHO cells. *mAbs*. Taylor & Francis, pp. 571-583.
- Ryll, T., Valley, U., Wagner, R., (1994) Biochemistry of growth inhibition by ammonium ions in mammalian cells. *Biotechnology and bioengineering* 44, 184-193.
- Safina, G., Duran, I.B., Alasel, M., Danielsson, B., (2011) Surface plasmon resonance for real-time study of lectin-carbohydrate interactions for the differentiation and identification of glycoproteins. *Talanta* 84, 1284-1290.
- Seo, J.S., Min, B.S., Kim, Y.J., Cho, J.M., Baek, E., Cho, M.S., Lee, G.M., (2014) Effect of glucose feeding on the glycosylation quality of antibody produced by a human cell line, F2N78, in fed-batch culture. *Applied microbiology and biotechnology* 98, 3509-3515.
- Shinohara, Y., Furukawa, J.-i., (2014) Surface Plasmon Resonance as a Tool to Characterize Lectin-Carbohydrate Interactions. *Lectins: Methods and Protocols*, 185-205.
- Sinclair, A.M., Elliott, S., (2005) Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. *Journal of pharmaceutical sciences* 94, 1626-1635.
- Solá, R.J., Griebenow, K., (2009) Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. *Journal of pharmaceutical sciences* 98, 1223-1245.
- Swiech, K., Picanco-Castro, V., Covas, D.T., (2012) Human cells: new platform for recombinant therapeutic protein production. *Protein expression and purification* 84, 147-153.
- Tangvoranuntakul, P., Gagneux, P., Diaz, S., Bardor, M., Varki, N., Varki, A., Muchmore, E., (2003) Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 12045-12050.
- Toussaint, C., Henry, O., Durocher, Y., (2016) Metabolic engineering of CHO cells to alter lactate metabolism during fed-batch cultures. *Journal of biotechnology* 217, 122-131.
- Vallée, C., Durocher, Y., Henry, O., (2014) Exploiting the metabolism of PYC expressing HEK293 cells in fed-batch cultures. *Journal of biotechnology* 169, 63-70.
- Villacrés, C., Tayi, V.S., Lattová, E., Perreault, H., Butler, M., (2015) Low glucose depletes glycan precursors, reduces site occupancy and galactosylation of a monoclonal antibody in CHO cell culture. *Biotechnology journal* 10, 1051-1066.

- Wilkins, C.A., Gerdtzen, Z.P., (2015) Comparative Metabolic Analysis of CHO Cell Clones Obtained through Cell Engineering, for IgG Productivity, Growth and Cell Longevity. PloS one 10, e0119053.
- Yang, M., Butler, M., (2000) Effects of ammonia on CHO cell growth, erythropoietin production, and glycosylation. Biotechnology and bioengineering 68, 370-380.

## CHAPITRE 5    ARTICLE 2: COMBINING METABOLIC AND PROCESS ENGINEERING STRATEGIES TO IMPROVE RECOMBINANT GLYCOPROTEIN PRODUCTION AND QUALITY

Eric Karengera, Yves Durocher, Gregory De Crescenzo and Olivier Henry

### 5.1 Présentation de l'article

Cette section présente l'article « *Combining metabolic and process engineering strategies to improve recombinant glycoprotein production and quality* ». Cet article a été soumis à la revue *Applied Microbiology and Biotechnology*.

Dans la première étape de cette thèse, nous avons démontré que la surexpression du gène PYC2 dans les cellules HEK293 mène à des conditions de culture plus favorables pour la qualité de l'interféron  $\alpha 2b$ . Le phénotype des cellules PYC2 fait donc d'elles des candidats de choix pour la production de glycoprotéines thérapeutiques de haute qualité. Cependant, malgré une réduction significative de la production de lactate, la production d'ammonium par les cellules PYC2 reste importante. Cela est particulièrement marqué dans les cultures *fed-batch*, dans lesquelles les cellules PYC2 génèrent une aussi grande concentration d'ammonium que les cellules parentales en fin de procédé (Toussaint et al., 2016; Vallée et al., 2014). Comme le métabolisme PYC2 mène à une plus faible production de lactate, l'ammonium reste donc le principal métabolite qui limite la croissance des cellules en plus de la qualité des protéines. Dans cette deuxième partie du travail, nous avons donc ciblé la production d'ammonium par des stratégies combinant le métabolisme PYC2 avec des approches de substitution de la glutamine afin de mettre en évidence un éventuel effet synergique sur la production et la qualité de la protéine thérapeutique recombinante. Ces travaux ont montré que la substitution de la glutamine par le pyruvate améliore la croissance de la lignée parentale ainsi que la production volumétrique d'interféron  $\alpha 2b$  chez la lignée parentale et la lignée PYC2. Enfin, en alimentant le glucose et le pyruvate dans les cultures PYC2, supplémentées de précurseurs de la glycosylation, il fut possible de concilier une haute production avec une haute qualité d'IFN $\alpha 2b$ .

## **5.2 Combining metabolic and process engineering strategies to improve recombinant glycoprotein production and quality.**

**Eric Karengera<sup>a</sup>, Yves Durocher<sup>b</sup>, Gregory De Crescenzo<sup>a</sup> and Olivier Henry<sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup> Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montréal (QC), Canada H3C 3A7

<sup>c</sup> Human Health Therapeutics Portfolio, National Research Council Canada, Montréal, Canada

\*Corresponding author: Olivier Henry at Chemical Engineering Department of École Polytechnique de Montréal, C.P. 6079, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3A7. Tel.: +1 514 340 4711 2191; fax: +1 514 340 4159.

E-mail address: [olivier.henry@polymtl.ca](mailto:olivier.henry@polymtl.ca)

### 5.2.1 Abstract

Increasing recombinant protein production while ensuring a high and consistent protein quality remains a challenge in mammalian cell culture process development. In this work, we combined a nutrient substitution approach with a metabolic engineering strategy that improves glucose utilization efficiency. This combination allowed us to tackle both lactate and ammonia accumulation and investigate on potential synergistic effects on protein production and quality. To this end, HEK293 cells overexpressing the Pyruvate Yeast Carboxylase (PYC2) and their parental cells, both stably producing the therapeutic glycoprotein interferon  $\alpha 2b$  (IFN $\alpha 2b$ ), were cultured in media deprived of glutamine but containing chosen substitutes. Among the tested substitutes, pyruvate led to the best improvement in growth for both cell lines, whereas the culture of PYC2 cells without neither glutamine nor any substitute displayed surprisingly enhanced IFN $\alpha 2b$  production. The drastic reduction in both lactate and ammonia in the cultures translated into extended high viability conditions and an increase in recombinant protein titer by up to 47 % for the parental cells and the PYC2 cells. Product characterization performed by surface plasmon resonance biosensing using *Sambucus nigra* (SNA) lectin revealed that the increase in yield was however accompanied by a reduction in the degree of sialylation of the product. Supplementing cultures with glycosylation precursors and a cofactor was effective at counterbalancing the lack of glutamine and allowed improvement in IFN $\alpha 2b$  quality as evaluated by lectin affinity. Our study provides a strategy to reconcile protein productivity and quality and highlights the advantages of PYC2-overexpressing cells in glutamine-free conditions.

**Keywords:** HEK293 cells, PYC2-overexpression, protein sialylation, nutrient substitution

### 5.2.2 Introduction

The accumulation of metabolic waste is a major hurdle for recombinant protein production and quality in mammalian cell culture processes. Strategies to mitigate the accumulation of lactate and ammonia, the most detrimental waste metabolites, have been extensively studied. Approaches relying on glucose and glutamine substitutions (Altamirano et al. 2000; Ha and Lee 2015), on maintaining the main nutrient at low concentration (Chee Fung Wong et al. 2005) or on genetic engineering of the producer cell lines (Irani et al. 1999; Zhou et al. 2011) have proven successful at improving protein titer as a result of lower lactate and/or ammonia accumulation. However, special care should be taken when controlling nutrient at low concentration as it can affect protein quality by limiting the availability of nucleotide sugars, the key precursors for N- and O-glycosylation (Chee Fung Wong et al. 2005; Hayter et al. 1992).

Protein glycosylation is a post-translational modification that impacts essential properties of therapeutic glycoproteins. Glycosylation is influenced by several factors such as the host cell, the recombinant protein or the culture process parameters (Hossler et al. 2009). It plays a major role in protein structure, solubility, resistance to physicochemical and enzymatic degradation and bioactivity (Sinclair and Elliott 2005; Sola and Griebenow 2010). For example, the presence of sialic acid on the terminal ends of the N- or O-glycan branches has a crucial influence on the fate of the protein in serum (Erbayraktar et al. 2003; Morell et al. 1971). Sialylated glycoproteins show increased in-vivo half-life as the display of sialic acid residues blocks protein interactions with the asialoglycoprotein receptors located on liver cells, in turn limiting protein clearance from the circulatory system (Ashwell and Harford 1982; Morell et al. 1971). Moreover, for patient safety concerns, it is important to mitigate the presence of non-human glycosylation pattern that can be added to therapeutic glycoproteins, depending on the producer cell line and culture conditions (Ghaderi et al. 2012). In this regard, although the production of recombinant glycoproteins is dominated by CHO cell lines, there is a growing interest for human cell lines to address the problems of non-human glycosylation patterns that are observed in glycoproteins produced by CHO cells (Swiech et al. 2012). Glycosylation is therefore considered a critical quality attribute and its high sensitivity to culture conditions makes it challenging to increase protein titers while ensuring consistent protein quality.

One can rely on genetic engineering strategies to develop cell lines with improved glycosylation capability, for instance by overexpressing sialyltransferase and galactosyltransferase (Raymond et al. 2015). Furthermore, optimization of culture conditions can be performed to rapidly and efficiently modulate protein production and quality (Bruhlmann et al. 2015). In this regard, the central carbon metabolism of mammalian cells has an important role to play in the control of protein quality (McAtee et al. 2014). Indeed, as the glucose catabolism provides the essential nucleotide sugar molecules for the glycosylation process, low glucose concentration (as low as 12.5 mM) or its complete depletion during cell culture could give rise to lower-quality glycoforms or non-glycosylated proteins (Liu et al. 2014). Although one can address this problem by maintaining sufficient glucose level, a fine balance must be achieved to limit the toxicity of lactate accumulation in culture. A more effective approach would be the use of a cell line with improved glucose utilization such as the PYC2-overexpressing cells (Irani et al. 1999; Toussaint et al. 2016; Vallee et al. 2014). Indeed, even though there is no direct correlation between lactate and protein glycosylation decrease, lactate accumulation has to be countered to promote cell growth, cell culture viability and a high productivity. Also, in addition to be a well-known inhibitory factor of cell growth and recombinant protein production, ammonia concentrations as low as 2 mM have proven deleterious for the glycosylation mechanism (Andersen and Goochee 1995). Therefore, to reduce ammonia accumulation and thereby favor recombinant protein quality, some authors had successful results by substituting glutamine by less ammoniagenic metabolites or by maintaining low glutamine concentration in the cultures (Chee Fung Wong et al. 2005; Wong et al. 2010a).

Previously, our group demonstrated the advantages related to the overexpression of the gene of the yeast pyruvate carboxylase (PYC2) in mammalian cells for the development of high-titer fed-batch cultures (Toussaint et al. 2016; Vallee et al. 2014). Although drastic reduction in lactate accumulation was always observed, ammonia production was not much impacted by the PYC2 overexpression. Moreover, due to the use of a concentrated feed solution and the extended duration of PYC2 cell cultures, high ammonia levels were generally observed at the end of fed-batch cultures. In this study, we targeted the reduction of both lactate and ammonia accumulation by combining the PYC2 strategy with several glutamine substitution approaches. To this end, alternative substrates, namely pyruvate, glutamate and  $\alpha$ -ketoglutarate, were used in lieu of glutamine in cultures of a PYC2-overexpressing HEK293 cells and its parental cell line both stably producing the therapeutic glycoprotein interferon  $\alpha 2b$  (IFN $\alpha 2b$ ), which is O-glycosylated at only

one site. Although these compounds have already been studied as potential glutamine substitutes in mammalian cell culture, our study investigated on potential synergic effects arising from their combination with the improved central carbon metabolism displayed by PYC2-overexpressing cells. The substitute that improved cell growth while reducing ammonia accumulation was then employed in cultures with supplementation to optimize IFN $\alpha$ 2b production and quality.

## **5.2.3 Materials and methods**

### **5.2.3.1 Cell lines**

The HEK293-D9 stably producing the IFN $\alpha$ 2b was developed from the HEK293-6E cell line constitutively expressing the EBNA1 of Epstein Barr Virus as previously described in Loignon et al. (2008). The HEK293-F5 cell line overexpressing the PYC2 gene was derived from the HEK293-D9 clone that was transfected with the pCEP5a vector encoding for the yeast pyruvate carboxylase 2 gene (GeneID: 852519) as described by Henry and Durocher (2011).

### **5.2.3.2 Batch cultures**

Batch cultures of HEK293-F5 (referred as the PYC2 cells) and HEK293-D9 (referred as the parental cells) were performed in duplicate in shake flasks with an initial culture volume of 30 mL. Freestyle F17 media (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma) containing 0.1 % of Pluronic F-68 (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO), and 0.3 % of anti-clumping agent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma) was supplemented either with glutamine, glutamate, pyruvate or  $\alpha$ -ketoglutarate to a concentration of 4 mM, 3 mM, 10 mM and 4 mM respectively. These molecules that were used as glutamine substitutes were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO). A control culture without neither glutamine nor any glutamine substitute was also performed. Batch cultures inoculated at a cell density of  $0.2 \times 10^6$  cells/mL were incubated at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> and agitated at 130 rpm. Sampling was performed daily to evaluate cell concentration using a hemacytometer (Reichert, Buffalo, NY) and cell viability by Trypan blue exclusion. Samples were aliquoted and stored at -20°C for subsequent analysis.

### **5.2.3.3 Glucose and pyruvate supplemented cultures**

Cultures in shake flasks were initiated in 30 mL of basal media consisting in Freestyle F17 containing 0.1 % of Pluronic F-68, 0.3% of anti-clumping agent and 1 mM glutamine. Feeding was



initiated at day 2 of the cultures. Glucose was provided to all the cultures by the addition of a concentrated glucose solution at 150 mM to keep its concentration between 20 mM and 30 mM. In addition to glucose, a concentrated glutamine solution at 200 mM (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) was fed in the control cultures (referred as the Glc/Gln culture) to maintain the glutamine concentration at around 2 mM. In addition to glucose, the cultures with pyruvate (referred as the Glc/Pyr culture) were fed every 2 days with a concentrated sodium pyruvate solution at 20 mM. In order to modulate IFN $\alpha$ 2b glycosylation in the pyruvate-fed cultures, further addition of ManNAc and cytidine (referred as the ManNAc/Cyt culture) or ManNAc, cytidine and manganese (referred as the ManNAc/Cyt/Mn culture) was tested. To this end, 200  $\mu$ mol of ManNAc and 100  $\mu$ mol of cytidine were added to the ManNAc/Cyt cultures at day 2, 5 and 10. In the ManNAc/Cyt/Mn cultures, 0.2  $\mu$ mol of manganese from a manganese chloride solution at 200  $\mu$ M was added in the ManNAc/Cyt cultures at day 6. ManNAc, cytidine and manganese chloride were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

#### 5.2.3.4 Metabolites analysis and specific-rates calculation

Glutamine, glucose and lactate concentration in supernatants were measured with an YSI2700 biochemistry analyzer (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH). Ammonia concentration was assessed with an ammonia assay kit following the recommendation of the manufacturer (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO). The cell-specific glucose consumption rates ( $qGlc$ ) and lactate production rates ( $qLac$ ) were calculated using the following equations:

$$qGlc = -\frac{1}{X_V} \frac{dGlc}{dt} \quad \text{Equation 1}$$

$$qLac = \frac{1}{X_V} \frac{dLac}{dt} \quad \text{Equation 2}$$

With  $X_V$  denoting the viable cell density ( $\times 10^6$  cells/mL),  $t$  the time (days) and Glc and Lac the glucose and lactate concentration in the culture, respectively.

#### 5.2.3.5 IFN $\alpha$ 2b purification by cation exchange chromatography

The IFN $\alpha$ 2b from culture supernatants was purified by cation exchange chromatography using an Äkta Explorer System (GE healthcare, Baie-d’Urfé, QC). The equilibration buffer was a solution of 0.1 M tri-sodium citrate pH 3.5 containing 0.35 M NaCl. The elution buffer was a solution of 0.1 M Tri-Na citrate pH 6 containing 0.35 M NaCl. First, 10 mL of culture supernatant

was diluted with the equilibration buffer to lower the pH of the solution to around pH 3.5. The resulting solution was then loaded onto a Tricorn™ Mono-S 10/100 GL column (GE healthcare, Baie-d'Urfé, QC) equilibrated with the equilibration buffer. The column was then washed with the equilibration buffer before eluting with an increasing pH gradient from pH 3.5 to pH 6 using the elution buffer. Finally, the IFN $\alpha$ 2b fraction was desalted and buffer exchanged by filtration against PBS using 3K centrifugal filter (Pall Corporation, Mississauga, ON).

#### **5.2.3.6 Evaluation of IFN $\alpha$ 2b concentration using surface plasmon resonance (SPR)**

Interferon  $\alpha$ 2b concentration from culture harvests was evaluated with a surface plasmon resonance (SPR)-based Biacore T100 biosensor (GE healthcare, Baie-d'Urfé, QC). To this aim, a monoclonal anti-IFN $\alpha$ 2b antibody (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma) was immobilized on CM5 sensor chips by standard amine coupling procedure (Fischer 2010). Briefly, carboxymethylated groups on the CM5 chip were activated by injecting at 5  $\mu$ L/min a solution containing equal volumes of 100 mM N-hydroxysuccinimide (NHS) and 400 mM 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) for 7 min. This was followed by the injection of the monoclonal anti-IFN $\alpha$ 2b antibody diluted at 50 mg/L in acetate buffer pH 5 at the same flow rate for 10 min. For the mock surface, no protein was injected. Then, unreacted carboxymethylated groups were blocked by the injection of ethanolamine 1 M pH 8 at 5  $\mu$ L/min for 7 minutes. Following this procedure, we succeeded to immobilize 14000 RU of antibody on the surface. HBS-EP buffer (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% v/v Surfactant P20) was used as running buffer for all the SPR experiments. A calibration curve was constructed by injecting serial dilutions of a known concentration of pure IFN $\alpha$ 2b and the corresponding slopes of the signal at 2 s after the samples injections were plotted against IFN $\alpha$ 2b concentration. Then, clarified supernatants collected at harvest of the cultures and diluted in HBS-EP were analyzed in duplicate to quantify final IFN $\alpha$ 2b titer.

#### **5.2.3.7 Evaluation of IFN $\alpha$ 2b glycosylation using surface plasmon resonance (SPR) biosensing with SNA lectin**

For IFN $\alpha$ 2b glycosylation analysis by SPR, *Sambucus nigra* (SNA) lectin (50 mg/mL, Vector Laboratories, Burlingame, CA) was immobilized on CM5 chips by the amine coupling method as described above for the antibody anti-IFN $\alpha$ 2b. This allowed immobilizing around 1800 RU of SNA

on the CM5 chip. Prior to culture sample analysis, we assessed the ability of the lectin to detect protein sialylation specifically. For this end, a purified sample of IFN $\alpha$ 2b was treated with sialidases to remove all the linked sialic acid. Then, by mixing untreated (hence sialylated) sample and desialylated sample of IFN $\alpha$ 2b we generated IFN $\alpha$ 2b samples that were sialylated at 0, 25, 50, 75 and 100 %. To evaluate the sialylation of IFN $\alpha$ 2b in culture samples, purified samples of IFN $\alpha$ 2b diluted at 100 mg/L in HBS-EP were injected on the surfaces harboring the lectins. The SPR sensorgrams were normalized to allow comparison between the proteins produced in different culture conditions. Signal values at 180 seconds after the end of sample injection (300 s after the start of the cycle) were used for comparison. The analysis was performed in duplicate.

#### **5.2.3.8 Desialylation of IFN $\alpha$ 2b**

To desialylate IFN $\alpha$ 2b, 2 mIU of neuraminidase from *Arthrobacter ureafaciens* (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) was mixed with 100  $\mu$ g of purified IFN $\alpha$ 2b in 50 mM sodium phosphate buffer pH 5.0. The samples were then incubated at 37 °C for 1 hour. For the untreated controls, 50 mM sodium phosphate at pH 5.0 was added instead of neuraminidase.

### **5.2.4 Results**

#### **5.2.4.1 Impact of glutamine substitution in batch cultures**

Batch cultures were performed to assess the potential of pyruvate,  $\alpha$ -ketoglutarate and glutamate as efficient glutamine substitutes in cultures of PYC2-overexpressing HEK293 cells and their parental cells. As negative control, glutamine-free batch cultures of both cell lines were also performed.

The batch cultures of the PYC2 cells containing glutamine presented the highest maximal viable cell density (Figure 5.1) together with the highest cell specific growth rate (result not shown). Pyruvate was the glutamine substitute demonstrating the best performance with respect to cell growth, especially for the parental cells. Indeed, substituting glutamine by pyruvate significantly improved the growth of the parental cells by increasing the maximum viable cell density by 28% as a result of a significantly longer exponential growth phase and an extended period of high-viability conditions (Figure 5.1). In sharp contrast, the maximum viable cell density of PYC2-overexpressing cells was decreased by 30% in the culture with pyruvate by comparison

to the culture containing glutamine. However, this culture exhibited 4 additional days of high viability conditions (above 90 %) when compared to the PYC2 cells culture with glutamine. Surprisingly, the glutamine-free culture of PYC2 cells showed a rather sustained cellular growth and a similar growth rate as the culture with pyruvate and outperforming the cultures with  $\alpha$ -ketoglutarate and glutamate in terms of maximal viable cell density. When considering the tested conditions, it appears that the absence of glutamine can significantly improve the viability of PYC2 cells cultures. For the parental cells cultures, beside pyruvate, the effect of the other substitutes translated into an impaired cellular growth (Figure 5.1). This suggested a significantly more detrimental effect of the lack of glutamine on the parental cell growth.

To correlate the observed growth profiles with changes in the nutrient metabolism, we assayed glucose, lactate, glutamine, glutamate and ammonia. As expected, in all cases, the PYC2-overexpressing cell cultures displayed lower lactate accumulation by comparison to the parental cells (Figure 5.1). The control cultures containing glutamine led to the highest lactate concentrations for both cell lines with maximum values of 13 mM and 19 mM for the PYC2 cells and the parental cells, respectively. Interestingly, for both cell lines, the lowest peak of lactate was observed in the  $\alpha$ -ketoglutarate cultures, followed by the cultures with glutamate, and then, up to the same level, the cultures with pyruvate and those without neither glutamine nor a substitute. Although the parental cells exhibited lactate consumption in the cultures containing glutamine and the cultures with pyruvate, this was not markedly observed in the other cultures of this clone, probably due to the low viable cell densities. The lactate concentration in the culture with pyruvate of the parental cells peaked at 16 mM on day 6 then decreased gradually until reaching 8 mM at culture harvest, thus displaying a 27 % reduction in the final lactate concentration in comparison to the culture with glutamine. In sharp contrast, PYC2-overexpressing cells consumed lactate in all the tested conditions leading to negligible residual lactate concentration at the day of cultures harvest.

Notably, the batch cultures containing glutamate did not show any decrease of glutamate concentration during the cultures, suggesting that this supplemented amino acid is either not consumed or consumed and produced at similar rates. For both cell types, glutamate concentration remained at its initial concentration in batch culture.

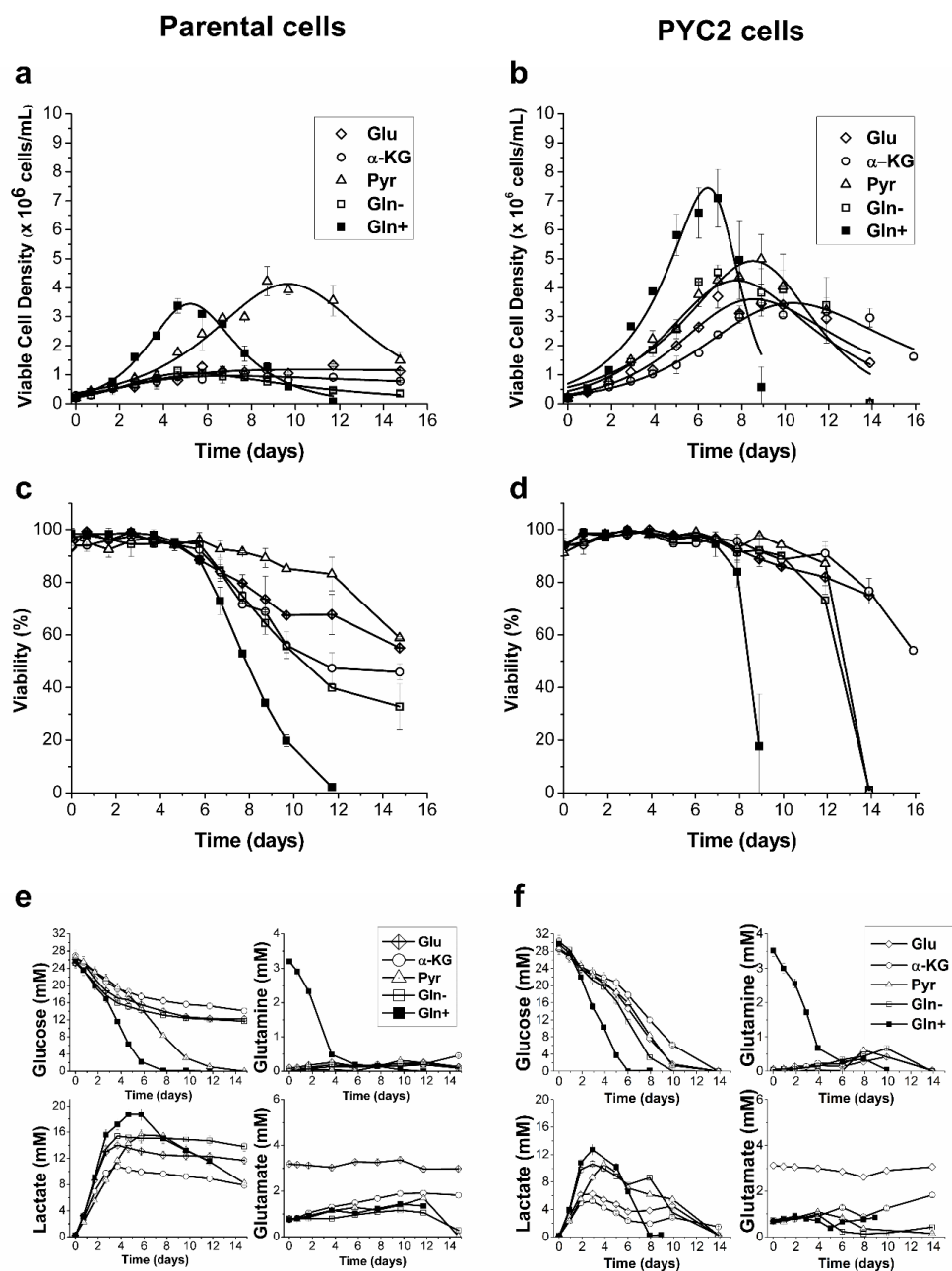


Figure 5.1 : Batch cultures of PYC2-overexpressing cells (charts on the right side) and the parental clone (charts on the left side). Cells were cultured in Freestyle F17 media without glutamine (Gln-) or supplemented with either 4mM glutamine (Gln+), 3mM glutamate (Glu), 10 mM pyruvate (Pyr) or 4 mM  $\alpha$ -ketoglutarate ( $\alpha$ -KG). Plotted against time are the viable cell density (a and b), the viability (c and d) and concentration of annotated metabolites (e and f). Error bars depict standard deviations of the measurements.

Cell specific consumption rates were evaluated during the exponential growth phase. Specifically, for lactate, the period considered for the calculation was the lactate production phase (Figure 5.2). As expected, the parental cells exhibited higher cell specific lactate production and higher lactate-to-glucose ratios than the PYC2 cells in each batch culture. Moreover, excepted for the culture with pyruvate, the parental cells showed higher specific glucose consumption rates by comparison to the PYC2 cells. Although we observed in the parental cells cultures with pyruvate an apparent decrease in the cell specific rates of glucose consumption and lactate production by comparison to the cultures with glutamine, this culture showed the highest lactate-to-glucose ratio which represented a 1.9-fold increase by comparison to the culture with glutamine. On the other hand, the PYC2 cells cultures demonstrated lactate-to-glucose ratios which stood below 1 in all the tested conditions. Hence, contrarily to the parental cells cultures, the PYC2 cells cultures without neither glutamine nor any substitute showed a slightly reduced cell specific glucose consumption rate by 12%. However, cell specific lactate production rate was increased by 17% leading to 31% increase in the lactate-to-glucose ratio.

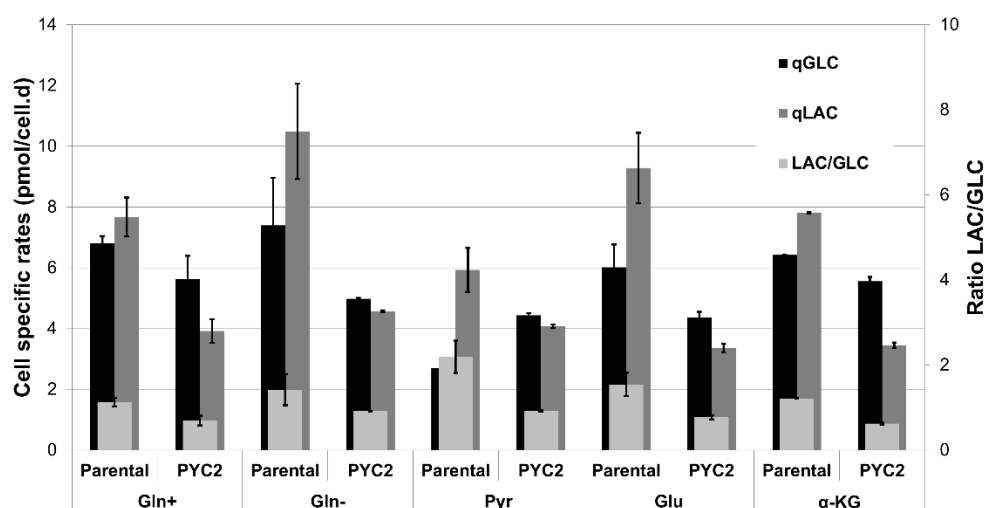


Figure 5.2 : Cell specific glucose consumption rates (qGlc), cell specific lactate production rates (qLac) and LAC/GLC ratios in batch cultures PYC2 cells and parental cells.

In addition of being a well-known inhibitor of cell growth and productivity, ammonia accumulation negatively affects protein quality (Andersen and Goochee 1995; Yang and Butler 2000). Among the existing strategies for reducing its accumulation, glutamine substitution remains

the most straightforward (Ha and Lee 2015). In our study, all the tested substitutes led to significantly lower ammonia accumulation in the batch cultures by comparison to the cultures containing glutamine (Figure 5.3). Final ammonia concentrations were reduced to values between 1mM and 1.5 mM. For the parental cells, except for the culture containing pyruvate, the lower ammonia concentrations observed can be attributed to the very low viable cell density displayed by the cultures. Interestingly, the parental cell culture containing pyruvate led to the highest reduction with a 55% decrease in final ammonia concentration. On the other hand, the PYC2 cell culture with pyruvate produced around 21% less ammonia than in the cultures containing glutamine (Figure 5.3). As ammonia is toxic for the cells, the reduction of its accumulation doubtlessly contributed to the observed improvements in cell viability.

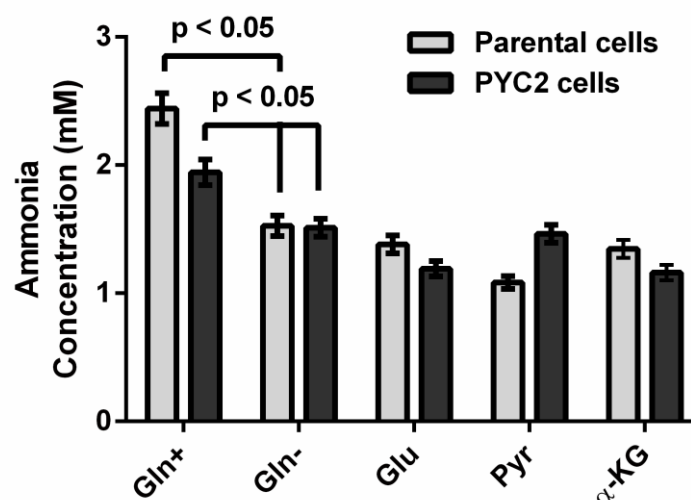


Figure 5.3 : Final ammonia concentration in batch cultures of PYC2-overexpressing cells (black bars) and the parental cells (grey bars). Error bars depict standard deviations of the measurements.

To assess the impact of the tested conditions on the productivity, a surface plasmon resonance assay was used to quantify the final IFN $\alpha$ 2b concentration from culture supernatants. In the PYC2 cell cultures, all the tested conditions led to an improvement of the final recombinant protein titer, albeit at various degrees (Figure 5.4). Notably, the culture without substitute nor glutamine surprisingly showed high recombinant protein production. Indeed, this culture demonstrated a 1.5-fold improvement in final IFN $\alpha$ 2b titer when compared to the glutamine supplemented cultures. This resulted from an extended culture duration combined to improvement in cell specific IFN $\alpha$ 2b productivity. Besides, substituting glutamine by pyruvate in batch cultures of both cell lines also

had a beneficial impact on protein titer. Indeed, this strategy led to a 1.5- and 1.4-fold increase of the final IFN $\alpha$ 2b concentration for the parental and the PYC2 cells, respectively. On the other hand, for the parental cells, only the cultures with pyruvate improved recombinant protein production. Indeed, as the absence of glutamine drastically impaired cell growth in the other parental cells cultures, this led to a significantly reduced recombinant protein production.

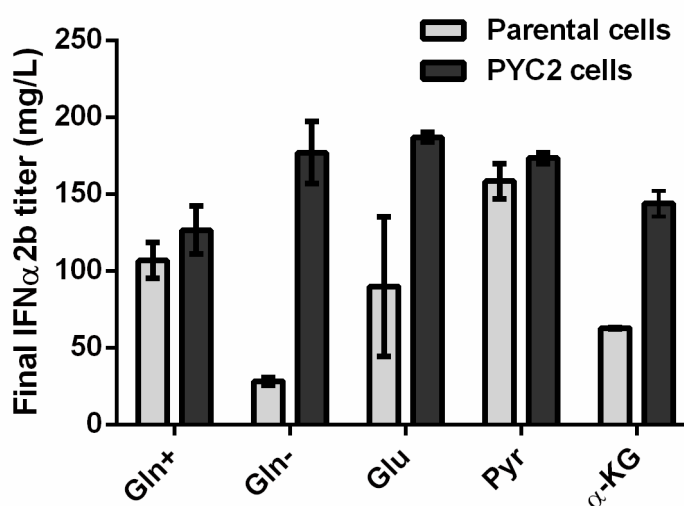


Figure 5.4: Final interferon  $\alpha$ 2b (IFN $\alpha$ 2b) titer in batch cultures of PYC2-overexpressing cells (black bars) and the parental cells (grey bars) as assayed by surface plasmon resonance (SPR) using an immobilized Anti-IFN $\alpha$ 2b antibody. Error bars depict standard deviations of the measurements.

#### 5.2.4.2 PYC2 cell cultures with supplements

The decrease of the availability of key precursors due to glucose depletion during the late stage of batch cultures is among the causes of lower protein glycosylation (Liu et al. 2014; Liu et al. 2013). Thus, maintaining sufficient glucose concentration during the cultures could help to sustain optimal recombinant protein glycosylation. Moreover, the use of PYC2-overexpressing cells would allow mitigating the subsequent lactate accumulation that is generally observed in mammalian cell line cultures. As pyruvate turned out to be a potent glutamine substitute in batch, it was supplemented along with glucose during the cultures of PYC2 cells to assess the possibility to further increase IFN $\alpha$ 2b production while supporting IFN $\alpha$ 2b quality. Starting at day 2, cultures were supplemented with glucose and glutamine (referred as the Glc/Gln culture) or with glucose and pyruvate (referred as the Glc/Pyr culture). To favor IFN $\alpha$ 2b sialylation, we also tested the



effect of N-Acetylmannosamine (ManNAc), cytidine and manganese supplementation (referred as ManNAc/Cyt culture and the ManNAc/Cyt/Mn culture). These are glycosylation precursors molecules and a cofactor known to modulate recombinant protein glycosylation (Crowell et al. 2007; Wong et al. 2010b). To boost cell growth and reduce the lag phase, we initiated the cultures with a low glutamine concentration (1 mM). Glucose concentration in the culture medium was evaluated every day and adjusted between 20 mM and 30 mM.

By comparison to the control Glc/Gln culture, the 3 cultures with glucose and pyruvate feeding demonstrated no longer lag phase and experienced extended high viability conditions (above 90%) for at least two additional days (Figure 5.5). Notably, the viability of the ManNAc/Cyt culture stayed above 90% until the time of harvest. In all the cultures, viable cell densities peaked roughly at the same concentrations ranging between  $4.5$  and  $5.5 \times 10^6$  cells/mL, which is similar to the maximum viable cell density observed in PYC2 cells batch cultures with pyruvate.

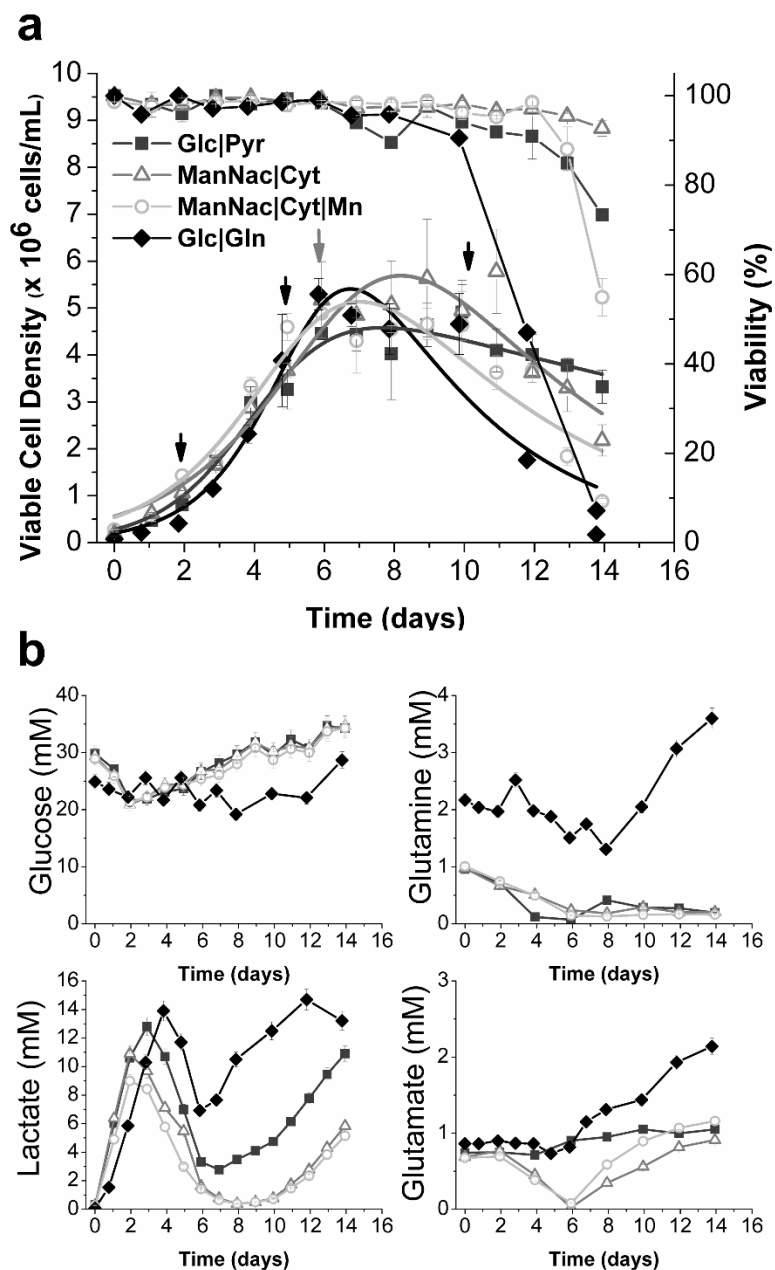


Figure 5.5: Cultures of PYC2 cells with supplementation. Profiles of viable cell density (a) and profiles of metabolites (b). In the Glc/Gln culture (solid diamonds), glucose and glutamine were supplemented along the culture. In the Glc/Pyr culture (solid squares) glucose and pyruvate instead of glutamine were provided to the culture. In ManNac/Cyt culture (open triangles), the culture fed with glucose and pyruvate was supplemented with ManNac and cytidine at the time points marked by a black arrow. In ManNac/Cyt/Mn culture (open circle), a ManNac/Cyt culture was supplemented with manganese at the time point marked by a grey arrow.

The profile of lactate concentration showed significant differences when compared to the batch cultures of PYC2. Indeed, the lactate production phase in the batch cultures of PYC2 cells was directly followed by lactate consumption until its depletion at the time of harvest (see Figure 5.1-e). However, when glucose and pyruvate or glutamine were added during the culture, they experienced a second lactate production phases (Figure 5.5). The onset of these second lactate production phases correlated with the peak in viable cell density and was not caused by an outbreak of cell death as no concomitant decrease in culture viability was observed. For instance, in the Glc/Gln culture, after peaking at 14 mM at day 4, the lactate concentration decreased to 7 mM at day 6 then started increasing again until reaching 15 mM at day 12. The same trend was observed, albeit at lesser extent, in the culture supplied with glucose and pyruvate (Glc/Pyr). Notably, even though a second production phase was also observed in the ManNAc/Cyt and ManNAc/Cyt/Mn cultures, the addition of ManNAc and cytidine significantly contributed to the reduction of lactate accumulation.

When compared to the batch cultures with glutamine, final ammonia concentration doubled in the Glc/Gln culture. Feeding glucose and pyruvate instead of glucose and glutamine decreased the final ammonia concentration by 53 %. Further supplementation of ManNAc and cytidine slightly increased the final ammonia concentration by 34% (Figure 5.6).

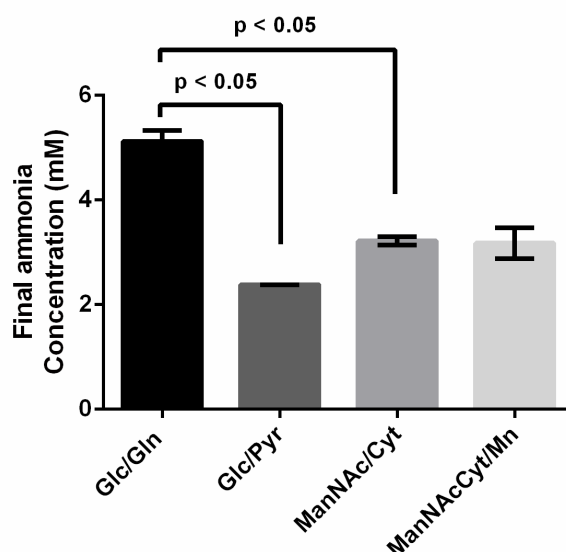


Figure 5.6 : Final ammonia concentration in the supplemented cultures of PYC2-overexpressing cells. Error bars depict standard deviations of the measurements

Supplementing glucose and pyruvate instead of glucose and glutamine during the cultures improved IFN $\alpha$ 2b production (Figure 5.7). However, when compared to the batch cultures in which pyruvate was only supplied at the beginning, this bolus-feed strategy did not translate into additional improvement in IFN $\alpha$ 2b titer. This could be due to the higher accumulation of ammonia that was observed in this culture (see Figure 5.6). While the supplementation of ManNAc and cytidine did not seem to impact recombinant protein production, further addition of manganese led to 25% reduction in IFN $\alpha$ 2b titer when compared to the Glc/Pyr culture. This is consistent with previous studies that observed the adverse effect of manganese on recombinant protein production (Crowell et al. 2007; Gramer et al. 2011).

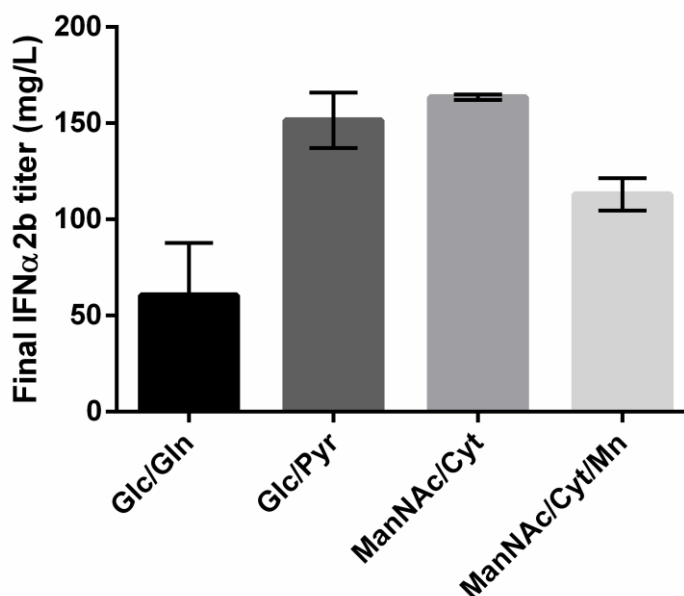


Figure 5.7: Final IFN $\alpha$ 2b titers in the cultures of PYC2-overexpressing with supplementation. Error bars depict standard deviations of the measurements.

#### 5.2.4.3 IFN $\alpha$ 2b quality evaluation

For the safety and the efficacy of the biotherapeutics, maintaining high protein quality should be considered as important as increasing recombinant protein titers. Thereby it is important to assess the effect of our strategies on the glycosylation of the IFN $\alpha$ 2b. To do so, the *Sambucus nigra* (SNA) lectin was immobilized at the surface of our SPR biosensor, as described in the materials and methods section. The SNA lectin is widely used for the detection of  $\alpha$ 2,6-linked sialylation in

N- and O-linked glycoproteins because of its relatively high specificity (Haseley et al. 1999; Safina et al. 2011). Control samples consisted of sialylated IFN $\alpha$ 2b diluted with various amounts of its asialylated form to generate solutions of identical IFN $\alpha$ 2b concentration but harboring different percentages of sialylation. As shown in Figure 5.8-a, an increase in sialylation percentage led to an increase in the amplitude of the recorded SPR signal for the SNA- IFN $\alpha$ 2b interactions. Of interest, when normalized, these sensorgrams were superimposed (Figure 5.8-b), indicating that the shape of the normalized SNA-IFN $\alpha$ 2b sensorgram is a signature of a given IFN $\alpha$ 2b sialylation pattern while the amplitude of the raw sensorgram is linked to the concentration of sialylated IFN $\alpha$ 2b.

In stark contrast with our control experiment, the sensorgrams corresponding to the interaction between SNA and IFN $\alpha$ 2b originating from the glutamine-substituted cultures harbored different amplitudes (Figure 5.8-c) as well as different kinetic profiles once normalized (especially during dissociation of the SNA-IFN $\alpha$ 2b complex – see Figure 5.8-d). This indicated that the IFN $\alpha$ 2bs from these cultures were different in their type of sialylation pattern. Indeed, for the cultures with glutamine, the IFN $\alpha$ 2b from the PYC2-overexpressing cells interacted more stably with the lectin when compared to the IFN $\alpha$ 2b from the parental cells (Figure 5.8-e). This was also observed in our previous study (Karengera et al. 2017). No significant difference was found between the IFN $\alpha$ 2b derived from the cultures with pyruvate and the PYC2 cells cultures with  $\alpha$ -ketoglutarate and without glutamine. The protein from these cultures presented 30 % reduction in the interaction with SNA by comparison with the IFN $\alpha$ 2b derived from the culture with glutamine, suggesting that the total absence of glutamine may impair sialylation. For the experiments where glucose and pyruvate were supplemented along the culture, the absence of glutamine also corresponded to a decrease in the interaction of IFN $\alpha$ 2b with SNA, as can be seen by comparing the normalized interaction for the Glc/Gln and the Glc/Pyr cultures (Figure 5.8-f). Although supplementing pyruvate instead of glutamine decreased the interaction by 24 % in the Glc/Pyr, supplying ManNAc and cytidine to the cultures helped recover a high level of SNA/IFN $\alpha$ 2b interaction. Further addition of manganese did not lead to more change in the interactions between the lectin and IFN $\alpha$ 2b. This suggests that even when glucose concentration is kept high in the culture, replacing glutamine by pyruvate may affect IFN $\alpha$ 2b quality. Nonetheless, the results demonstrated that the supplementation of the sialylation precursors, ManNAc and cytidine helped to sustain a stable interaction with the sialic acid specific lectin. ManNAc, combined or not with

cytidine have also shown to improve recombinant glycoproteins sialylation in other studies (Gu and Wang 1998; Wong et al. 2010b).

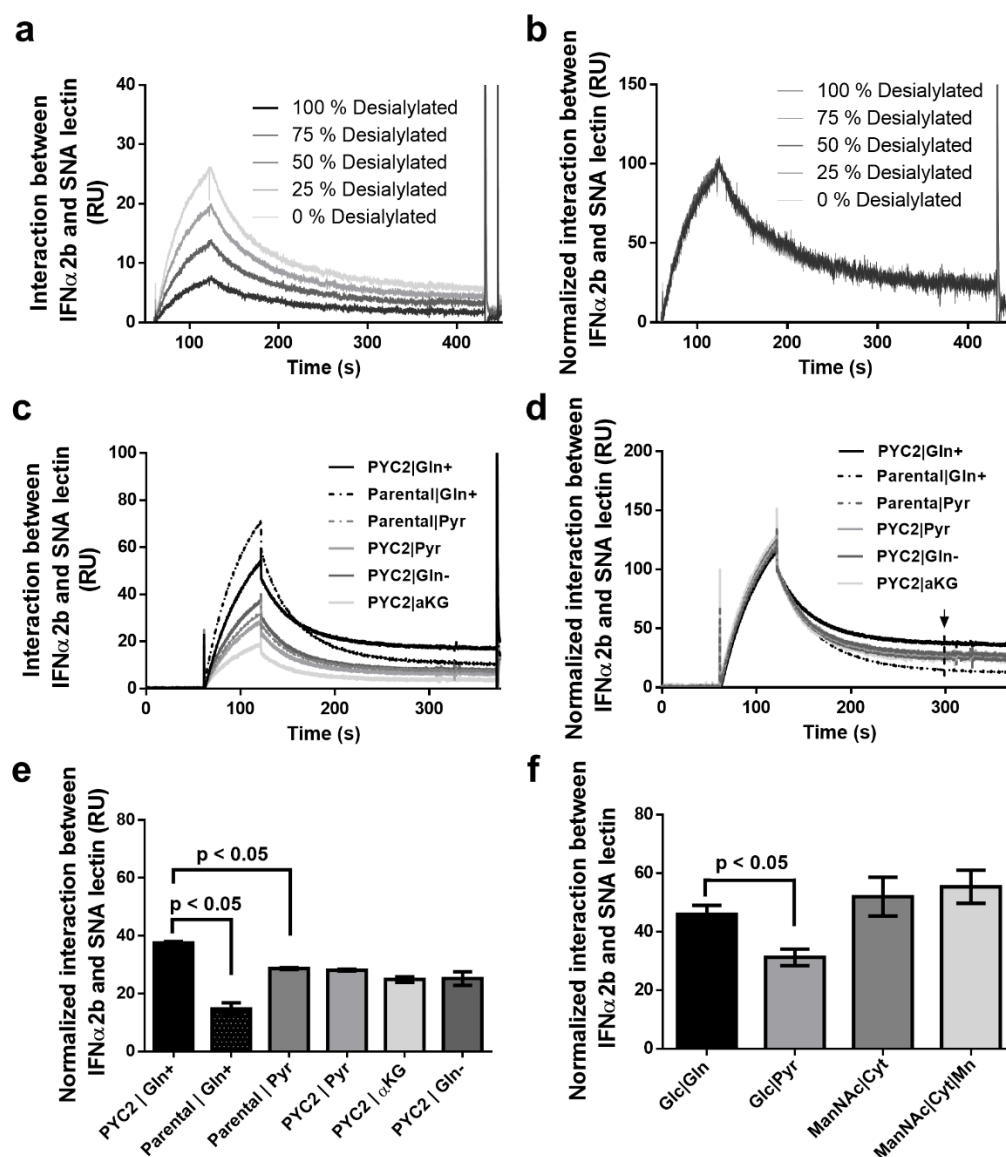


Figure 5.8 : Analysis of the interaction between IFN $\alpha$ 2b and SNA lectin. Raw sensorgram data of the interaction of SNA lectin with pure IFN $\alpha$ 2b at 50 mg/L at different desialylation levels (a). Normalized sensorgram data of the interaction of SNA lectin with pure IFN $\alpha$ 2b at 50 mg/L at different desialylation levels (b). Raw sensorgram data of the interaction of SNA lectin with pure IFN $\alpha$ 2b from the cultures with glutamine substitutions (c). Normalized sensorgram data of the interaction of SNA lectin with pure from the cultures with glutamine substitutions (d). Normalized

interaction levels between SNA and IFN $\alpha$ 2b from the glutamine-substituted cultures (e) and the supplemented cultures (f). For E and F, the SPR response corresponding to the 300-s time point in panel d (see arrow) was used as an indication of the SNA- IFN $\alpha$ 2b complex stability and thus of the type of sialylation pattern on IFN $\alpha$ 2b.

In summary, substituting glutamine by pyruvate significantly improved cell growth and IFN $\alpha$ 2b production in the culture of PYC2-overexpressing cells and the parental cells. This was the consequence of important decrease in lactate and ammonia accumulation. However, even when glucose concentration was maintained high in the culture, the decrease in SNA/IFN $\alpha$ 2b interaction stability detected in batch cultures of PYC2 cells is similarly observed in the pyruvate-supplemented cultures. Nonetheless, supplementing ManNAc and cytidine helps recovers that interaction. This implies that substituting glutamine by pyruvate while supplementing ManNAc and cytidine allows to reconcile protein productivity and quality in PYC2-cells cultures.

### 5.2.5 Discussion

Glucose and glutamine are major nutrients that provide to mammalian cells the energy and the substrates for growth and macromolecules synthesis. Unfortunately, their consumption is characterized by high uptake rates and the generation of inhibitory amounts of metabolic waste in culture, among which lactate and ammonia are considered the most detrimental (Cruz et al. 2000; Hassell et al. 1991). The accumulation of these metabolites has a negative impact on cell culture performance since it impairs cell growth, recombinant protein production and quality (Andersen and Goochee 1995; Yang and Butler 2000). Even though no direct detrimental effect of lactate on product quality has been demonstrated yet, its accumulation has to be mitigated to favor cell viability and thus ensure optimal environmental conditions for recombinant protein quality. By improving glucose utilization efficiency, metabolic engineering strategies such as the overexpression of the PYC2 gene in mammalian cells help address the problem of lactate accumulation (Elias et al. 2003; Irani et al. 1999). Ammonia in particular has been linked to protein quality alteration by several mechanisms such as by disrupting the inter-Golgi pH, which impacts the optimal functioning of glycosylation enzymes (Andersen and Goochee 1995; Gawlitzek et al. 2000); 2) or by promoting the increase of UDP-N-Acetylhexoamine that competes with the CMP-N-Acetylneuraminic acid for the transport into the Golgi thus leading to increased glycan antennarity and decreased sialylation (Gawlitzek et al. 1998). While the PYC2 metabolism confers

a modest improvement of the glutamine metabolism, PYC2 cell cultures still exhibit intense ammonia production particularly in the late phase of fed-batch cultures (Toussaint et al. 2016; Vallee et al. 2014). Moreover, strategies to mitigate this accumulation by glutamine substitution approaches have not been considered yet.

The replacement of glutamine by glutamate has sometimes proven effective for reducing ammonia accumulation in mammalian cell cultures (Ferreira et al. 2005; Hong et al. 2010). Also,  $\alpha$ -ketoglutarate which is a TCA cycle intermediate, was shown to be effective at substituting glutamine by decreasing ammonia concentration by 4-fold and by increasing protein titer by 1.3-fold in the culture of a CHO cell line producing a Fc-fusion protein (Ha and Lee 2014). In our cultures, while the use of these two molecules led to a decrease in final ammonia concentration for both cell lines, only PYC2 cells showed benefit in term of IFN $\alpha$ 2b production. On the other hand, glutamate did not seem to be consumed by the cells, which can suggest that the relatively sustained growth observed in PYC2 cells culture is more attributable to the demonstrated capability of these cells to grow in glutamine-free environment than to the presence of glutamate.

Genzel et al. (2005) have reported that using pyruvate to replace glutamine in the cell culture media results in significant ammonia reduction in adherent cultures of MDCK, BHK21 and CHO-K1 cells (Genzel et al. 2005). In addition, this study showed an effect of this strategy on glucose metabolism as glucose uptake was reduced as well as lactate production. Our study demonstrated that pyruvate can efficiently substitute glutamine in the cultures of HEK293 cells as well. Indeed, only pyruvate led to improved performance in the parental cells cultures suggesting that this substrate, when compared to the other substitutes we tested, is the most readily useable by the cells for proliferation and proteins production. To further ascertain that this observation is not just linked to clonal variation, we cultured the HEK293-6E clone in media without glutamine supplemented with pyruvate. The parental cells (HEK293-D9) were derived from the HEK293-6E clone being transfected with the gene of IFN $\alpha$ 2b (Loignon et al. 2008). The batch culture of HEK293-6E containing pyruvate confirmed our observations by exhibiting 1.5-fold improvement of the maximum viable cell density by comparison to the culture containing glutamine (see Annexe B, page 179). On the other hand, for PYC2 overexpressing cells, the effect of pyruvate markedly lowered cell growth while significantly improving final recombinant protein titer. Moreover, despite this reduced cell growth, these cultures exhibited the second highest maximal cell density after the glutamine-supplemented PYC2 cells cultures. Studies have demonstrated that pyruvate is



used as an important substrate for mitochondrial respiration and proliferation in human cancer cells (Diers et al. 2012; Schell and Rutter 2013). Indeed, pyruvate represents a key metabolite because of its central location at the crossroads of the pathways of glucose, fatty acid and amino acid metabolism. The versatile functions of this metabolite allow it to be readily available for energy generation and for supporting anaplerotic reactions, which explains the ability of pyruvate to efficiently substitute glutamine in mammalian cell cultures.

The PYC2 modification conferred an advantage to the cells in cultures without neither glutamine nor a substitute. Although in these cultures, the PYC2 cells presented a reduced but rather sustained growth, the titer was enhanced 1.4-fold. In the same conditions, parental cells cultures displayed a low growth and a poorer protein production. These differences suggest an effect linked to the nutrient metabolism conferred by the PYC2 overexpression. Indeed, this implies that in absence of glutamine, the improved central carbon metabolism that characterizes PYC2 cells can support cell growth and protein production by using glucose as the main carbon source. This observation can be illustrated by several studies that made the observation that human cancer cells can rely, to some extent, on endogenous pyruvate carboxylase activity when insufficient glutamine conditions are encountered (Cheng et al. 2011; Davidson et al. 2016; Sellers et al. 2015). This implies that the overexpressed PYC2 enzyme could have played a crucial role in glutamine deprived conditions. On the other hand, it should be noted that mammalian cells can use endogenous glutamine synthetase (GS) to convert glutamate to glutamine, yet its activity is generally quite low and does not allow surviving in glutamine deprived condition. GS overexpression in mammalian cell lines significantly reduces ammonia accumulation in cultures (Paredes et al. 1999; Zhang et al. 2006). Recently, Da Young Yu and al. (2016) demonstrated that HEK293 cells possess, by comparison to CHO cells, a relatively higher endogeneous GS activity that can hamper the use of GS-mediated gene amplification and selection systems (Noh and Lee 2016). In our cultures, this characteristic could have helped the cell to generate minimal glutamine metabolites which, in combination with the PYC2 metabolism, allowed fuelling the TCA in order to maintain PYC2 cells proliferation and IFN $\alpha$ 2b production.

We observed differences in the lactate profile depending on the cell clone and the cell culture media. While the PYC2 cells consumed lactate in all cases, for the parental cells this was only particularly significant in the culture containing glutamine. In developing industrial cell culture process, lactate consumption is a highly desired characteristic since it is typically linked to

increased culture longevity and high recombinant protein titer (Le et al. 2012). In some studies, lactate consumption has been considered to be triggered by the depletion of glucose (Altamirano et al. 2006). In others, lactate consumption has been related to the oxidative metabolism and the glutamine availability (Luo et al. 2012; Zagari et al. 2013). More recently, lactate consumption in HEK293 cells cultures has been hypothesized as a pH detoxification strategy (Liste-Calleja et al. 2015). In our study, glutamine supplemented cultures experienced the highest lactate concentration and reached the lowest pH. Thus, considering the hypothesis of Liste-Calleja et al. (2015) this could explain the more rapid lactate consumption observed in these cultures. Moreover, in several other experiments, PYC2-overexpressing CHO and HEK293 cells have shown a tendency to consume lactate in culture (Toussaint et al. 2016; Vallee et al. 2014). With this study, we confirm the ability of PYC2 cells to consume lactate in a wider range of culture conditions.

The strategy consisting in feeding pyruvate instead of glutamine reduced lactate and ammonia accumulation which had a beneficial impact on PYC2 cells culture viability and IFN $\alpha$ 2b production. When combined with the supplementation of the glycosylation precursors ManNAc and cytidine, further reduction in lactate production was observed. Previously, Do Yun Kim et al. (2013) performed a feed glutamine replacement by culturing CHO cells in basal medium containing glutamine (4mM) before feeding the culture with a feed containing glutamine or pyruvate. The use of the feed containing pyruvate diminished ammonia concentration by 44% and increased the maximum protein titer by 60% without compromising the recombinant protein quality (Kim et al. 2013). In our culture, while improvement in ammonia reduction and IFN $\alpha$ 2b titer were observed, feeding pyruvate instead of glutamine impacted the quality as demonstrated by the lower SNA/IFN $\alpha$ 2b interaction. This implies that the deprivation of glutamine could be detrimental for glycosylation, as also postulated by some authors (Chee Fung Wong et al. 2005; Nyberg et al. 1999). Indeed, in addition to be a major carbon source for proliferating cells, the glutamine catalyzes the initial and rate limiting step of the hexosamine biosynthesis pathway, which provides the cells with nucleotide sugars that are essential substrates for glycosylation. This could explain, at least partially, the reduced sialylation we observed when glutamine was not supplied in the culture. ManNAc and cytidine are the precursors of CMP-sialic acid, the activated form of sialic acid required for protein sialylation. Yet, ManNAc can also be metabolized by the cells to generate GlcNAc and be introduced in the hexoseamine pathway to forms the other nucleotides sugars involved in glycosylation (Luchansky et al. 2003). While ManNAc

supplementation improved recombinant protein sialylation in several studies (Gu and Wang 1998; Wong et al. 2010b), some authors have reported no increase in sialylation with this approach. Upon ManNAc addition, the authors have observed concomitant increase in intracellular CMP-sialic acid but no overall increase in the recombinant protein sialylation produced in CHO and NSO cells (Baker et al. 2001; Hills et al. 2001; Kildegaard et al. 2016). Indeed, it was demonstrated that increased cytosolic pool of CMP-sialic acid could exert a strong feedback inhibition on UDP-GlcNAc 2-epimerase activity, the enzyme catalyzing the key step of sialic acid biosynthesis, namely the conversion of UDP-GlcNAc into UDP and ManNAc (Chen et al. 2016; Kornfeld et al. 1964). Nonetheless, supplementing ManNAc should allow to effectively bypass this regulation, which is intended to limit CMP-sialic acid accumulation (Hinderlich et al. 2013). Beside this major metabolic regulation mechanism of sialylation, it was suggested that the transport of CMP-sialic acid to the Golgi could be impaired by an elevated cytosolic level of UDP-N-Acetylhexosamine (such as UDP-GalNAc and UDP-GlcNAc) (Rijcken et al. 1995). In this regard, CMP-sialic acid transporter overexpression have showed a noticeable improvement in the sialylation of the interferon  $\gamma$  produced in CHO cells (Wong et al. 2006). Although intracellular levels of UDP-N-Acetylhexosamine were not assayed in our study, several studies have demonstrated an elevated intracellular concentration of this molecule upon ManNAc addition (Hills et al. 2001; Wong et al. 2010b). However, we hypothesize that the addition of ManNAc and cytidine contributed to increase the availability of glycosylation and sialylation precursors, which led to improvement of the interaction between IFN $\alpha$ 2b and the sialic acid-specific lectin, SNA. By acting as a key cofactor for the enzymes catalyzing the transfer of GalNAc and Gal residues on glycoproteins, manganese can help improving O-glycosylation site occupancy and sialylation (Crowell et al. 2007; Kaufman et al. 1994). However, in our study, its addition did not result in further change in lectins/IFN $\alpha$ 2b interaction.

We have demonstrated that substituting glutamine by pyruvate lead to significant reduction in lactate and ammonia generation in HEK293 cultures, which allow significant improvement in cell growth and final interferon  $\alpha$ 2b titer. Moreover, the PYC2 metabolism showed to confer an advantage in glutamine deprived conditions as glutamine-free batch cultures exhibited improved viability and enhanced IFN $\alpha$ 2b titer. Likewise, in glucose supplemented cultures, substituting glutamine by pyruvate improved culture viability and recombinant protein production. However, this affected IFN $\alpha$ 2b quality thus highlighting the important role of glutamine in the synthesis of

glycans. Nonetheless, the addition of glycosylation precursors and a cofactor was effective at counterbalancing the lack of glutamine and allowed improvement in IFN $\alpha$ 2b quality as evaluated by lectin affinity. While a LC-MS assay would provide a more complete characterization of the glycans and allow detecting more subtle changes in the glycoforms population, surface plasmon resonance assays exploiting lectins affinity for specific glycans provided a good and rapid insight on the effect of the adopted strategies on IFN $\alpha$ 2b glycosylation. This study provides additional evidence on the tight relation between the central carbon metabolism and protein quality and highlights the advantages of PYC2-overexpressing HEK293 cells in glutamine-free cultures.

### **5.2.6 Acknowledgements**

This work was supported by Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies (FRQNT, grant number 175187). Eric Karengera received a scholarship from Wallonia-Brussels International (WBI). This is NRC publication NRC-HHT\_53347.

## 5.2.7 References

- Altamirano C, Illanes A, Becerra S, Cairo JJ, Godia F (2006) Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose. *J Biotechnol* 125(4):547-56 doi:10.1016/j.jbiotec.2006.03.023
- Altamirano C, Paredes C, Cairo JJ, Godia F (2000) Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine. *Biotechnol Prog* 16(1):69-75 doi:10.1021/bp990124j
- Andersen DC, Goochee CF (1995) The effect of ammonia on the O-linked glycosylation of granulocyte colony-stimulating factor produced by chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 47(1):96-105 doi:10.1002/bit.260470112
- Ashwell G, Harford J (1982) Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu Rev Biochem* 51(1):531-54 doi:10.1146/annurev.bi.51.070182.002531
- Baker KN, Rendall MH, Hills AE, Hoare M, Freedman RB, James DC (2001) Metabolic control of recombinant protein N-glycan processing in NS0 and CHO cells. *Biotechnol Bioeng* 73(3):188-202
- Bruhlmann D, Jordan M, Hemberger J, Sauer M, Stettler M, Broly H (2015) Tailoring recombinant protein quality by rational media design. *Biotechnol Prog* 31(3):615-29 doi:10.1002/btpr.2089
- Chee Fung Wong D, Tin Kam Wong K, Tang Goh L, Kiat Heng C, Gek Sim Yap M (2005) Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation quality in CHO cell cultures. *Biotechnol Bioeng* 89(2):164-77 doi:10.1002/bit.20317
- Chen SC, Huang CH, Lai SJ, Yang CS, Hsiao TH, Lin CH, Fu PK, Ko TP, Chen Y (2016) Mechanism and inhibition of human UDP-GlcNAc 2-epimerase, the key enzyme in sialic acid biosynthesis. *Sci Rep* 6:23274 doi:10.1038/srep23274
- Cheng T, Sudderth J, Yang C, Mullen AR, Jin ES, Matés JM, DeBerardinis RJ (2011) Pyruvate carboxylase is required for glutamine-independent growth of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(21):8674-8679

- Crowell CK, Grampp GE, Rogers GN, Miller J, Scheinman RI (2007) Amino acid and manganese supplementation modulates the glycosylation state of erythropoietin in a CHO culture system. *Biotechnol Bioeng* 96(3):538-49 doi:10.1002/bit.21141
- Cruz HJ, Freitas CM, Alves PM, Moreira JL, Carrondo MJ (2000) Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. *Enzyme Microb Technol* 27(1-2):43-52
- Davidson SM, Papagiannakopoulos T, Olenchok BA, Heyman JE, Keibler MA, Luengo A, Bauer MR, Jha AK, O'Brien JP, Pierce KA, Gui DY, Sullivan LB, Wasylenko TM, Subbaraj L, Chin CR, Stephanopoulos G, Mott BT, Jacks T, Clish CB, Vander Heiden MG (2016) Environment Impacts the Metabolic Dependencies of Ras-Driven Non-Small Cell Lung Cancer. *Cell Metab* 23(3):517-28 doi:10.1016/j.cmet.2016.01.007
- Diers AR, Broniowska KA, Chang CF, Hogg N (2012) Pyruvate fuels mitochondrial respiration and proliferation of breast cancer cells: effect of monocarboxylate transporter inhibition. *Biochem J* 444(3):561-71 doi:10.1042/BJ20120294
- Elias CB, Carpentier E, Durocher Y, Bisson L, Wagner R, Kamen A (2003) Improving glucose and glutamine metabolism of human HEK 293 and trichoplusiani insect cells engineered to express a cytosolic pyruvate carboxylase enzyme. *Biotechnol Prog* 19(1):90-97
- Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie Q-w, Coleman T, Kreilgaard M, Torup L, Sager T, Erbayraktar Z, Gokmen N (2003) Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(11):6741-6746
- Ferreira T, Ferreira A, Carrondo M, Alves P (2005) Effect of refeed strategies and non-ammoniogenic medium on adenovirus production at high cell densities. *J Biotechnol* 119(3):272-280
- Fischer MJ (2010) Amine coupling through EDC/NHS: a practical approach Surface plasmon resonance. Springer, pp 55-73
- Gawlitsek M, Ryll T, Lofgren J, Sliwkowski MB (2000) Ammonium alters N-glycan structures of recombinant TNFR-IgG: degradative versus biosynthetic mechanisms. *Biotechnol Bioeng* 68(6):637-46

- Gawlitze M, Valley U, Wagner R (1998) Ammonium ion and glucosamine dependent increases of oligosaccharide complexity in recombinant glycoproteins secreted from cultivated BHK-21 cells. *Biotechnol Bioeng* 57(5):518-28
- Genzel Y, Ritter JB, Konig S, Alt R, Reichl U (2005) Substitution of glutamine by pyruvate to reduce ammonia formation and growth inhibition of mammalian cells. *Biotechnol Prog* 21(1):58-69 doi:10.1021/bp049827d
- Ghaderi D, Zhang M, Hurtado-Ziola N, Varki A (2012) Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation. *Biotechnol Genet Eng Rev* 28(1):147-176
- Gramer MJ, Eckblad JJ, Donahue R, Brown J, Shultz C, Vickerman K, Priem P, van den Bremer ET, Gerritsen J, van Berkel PH (2011) Modulation of antibody galactosylation through feeding of uridine, manganese chloride, and galactose. *Biotechnol Bioeng* 108(7):1591-1602
- Gu X, Wang DI (1998) Improvement of interferon-g sialylation in Chinese hamster ovary cell culture by feeding of N-acetylmannosamine. *Biotechnol Bioeng* 58(6):642-648
- Ha TK, Lee GM (2014) Effect of glutamine substitution by TCA cycle intermediates on the production and sialylation of Fc-fusion protein in Chinese hamster ovary cell culture. *J Biotechnol* 180:23-9 doi:10.1016/j.jbiotec.2014.04.002
- Ha TK, Lee GM (2015) Glutamine substitution: the role it can play to enhance therapeutic protein production. *Pharm Bioprocess* 3(3):249-261
- Haseley SR, Talaga P, Kamerling JP, Vliegthart JF (1999) Characterization of the carbohydrate binding specificity and kinetic parameters of lectins by using surface plasmon resonance. *Anal Biochem* 274(2):203-210
- Hassell T, Gleave S, Butler M (1991) Growth inhibition in animal cell culture. The effect of lactate and ammonia. *Appl Biochem Biotechnol* 30(1):29-41
- Hayter PM, Curling EM, Baines AJ, Jenkins N, Salmon I, Strange PG, Tong JM, Bull AT (1992) Glucose-limited chemostat culture of Chinese hamster ovary cells producing recombinant human interferon-gamma. *Biotechnol Bioeng* 39(3):327-35 doi:10.1002/bit.260390311

- Hills AE, Patel A, Boyd P, James DC (2001) Metabolic control of recombinant monoclonal antibody N-glycosylation in GS-NS0 cells. *Biotechnol Bioeng* 75(2):239-51
- Hinderlich S, Weidemann W, Yardeni T, Horstkorte R, Huizing M (2013) UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase (GNE): a master regulator of sialic acid synthesis *SialoGlyco Chemistry and Biology* I. Springer, pp 97-137
- Hong JK, Cho SM, Yoon SK (2010) Substitution of glutamine by glutamate enhances production and galactosylation of recombinant IgG in Chinese hamster ovary cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 88(4):869-76 doi:10.1007/s00253-010-2790-1
- Hossler P, Khattak SF, Li ZJ (2009) Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology* 19(9):936-49 doi:10.1093/glycob/cwp079
- Irani N, Wirth M, van Den Heuvel J, Wagner R (1999) Improvement of the primary metabolism of cell cultures by introducing a new cytoplasmic pyruvate carboxylase reaction. *Biotechnol Bioeng* 66(4):238-46
- Karengera E, Robotham A, Kelly J, Durocher Y, De Crescenzo G, Henry O (2017) Altering the central carbon metabolism of HEK293 cells: Impact on recombinant glycoprotein quality. *J Biotechnol* 242:73-82 doi:10.1016/j.jbiotec.2016.12.003
- Kaufman RJ, Swaroop M, Murtha-Riel P (1994) Depletion of manganese within the secretory pathway inhibits O-linked glycosylation in mammalian cells. *Biochemistry* 33(33):9813-9819
- Kildegaard HF, Fan Y, Sen JW, Larsen B, Andersen MR (2016) Glycoprofiling effects of media additives on IgG produced by CHO cells in fed-batch bioreactors. *Biotechnol Bioeng* 113(2):359-66 doi:10.1002/bit.25715
- Kim DY, Chaudhry MA, Kennard ML, Jardon MA, Braasch K, Dionne B, Butler M, Piret JM (2013) Fed-batch CHO cell t-PA production and feed glutamine replacement to reduce ammonia production. *Biotechnol Prog* 29(1):165-75 doi:10.1002/btpr.1658
- Kornfeld S, Kornfeld R, Neufeld EF, O'Brien PJ (1964) The Feedback Control of Sugar Nucleotide Biosynthesis in Liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 52(2):371-9



- Le H, Kabbur S, Pollastrini L, Sun Z, Mills K, Johnson K, Karypis G, Hu W-S (2012) Multivariate analysis of cell culture bioprocess data—lactate consumption as process indicator. *J Biotechnol* 162(2):210-223
- Liste-Calleja L, Lecina M, Lopez-Repullo J, Albiol J, Solà C, Cairó JJ (2015) Lactate and glucose concomitant consumption as a self-regulated pH detoxification mechanism in HEK293 cell cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 99(23):9951-9960
- Liu B, Spearman M, Doering J, Lattova E, Perreault H, Butler M (2014) The availability of glucose to CHO cells affects the intracellular lipid-linked oligosaccharide distribution, site occupancy and the N-glycosylation profile of a monoclonal antibody. *J Biotechnol* 170:17-27 doi:10.1016/j.jbiotec.2013.11.007
- Liu B, Villacres-Barragan C, Lattova E, Spearman M, Butler M Differential affects of low glucose on the macroheterogeneity and microheterogeneity of glycosylation in CHO-EG2 camelid monoclonal antibodies. In: *BMC Proc*, 2013. vol 7. BioMed Central, p 1
- Loignon M, Perret S, Kelly J, Boulais D, Cass B, Bisson L, Afkhamizarreh F, Durocher Y (2008) Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFN $\alpha$ 2b in HEK293 cells. *BMC Biotechnol* 8:65 doi:10.1186/1472-6750-8-65
- Luchansky SJ, Yarema KJ, Takahashi S, Bertozzi CR (2003) GlcNAc 2-epimerase can serve a catabolic role in sialic acid metabolism. *J Biol Chem* 278(10):8035-8042
- Luo J, Vijayasankaran N, Autsen J, Santuray R, Hudson T, Amanullah A, Li F (2012) Comparative metabolite analysis to understand lactate metabolism shift in Chinese hamster ovary cell culture process. *Biotechnol Bioeng* 109(1):146-56 doi:10.1002/bit.23291
- McAtee AG, Templeton N, Young JD (2014) Role of Chinese hamster ovary central carbon metabolism in controlling the quality of secreted biotherapeutic proteins. *Pharm Bioprocess* 2(1):63-74
- Morell AG, Gregoriadis G, Scheinberg IH, Hickman J, Ashwell G (1971) The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. *J Biol Chem* 246(5):1461-7
- Noh SM, Lee GM (2016) Limitations to the development of recombinant human embryonic kidney 293E cells using glutamine synthetase-mediated gene amplification: methionine sulfoximine resistance. *J Biotechnol*

- Nyberg GB, Balcarcel RR, Follstad BD, Stephanopoulos G, Wang DI (1999) Metabolic effects on recombinant interferon-gamma glycosylation in continuous culture of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 62(3):336-47
- Paredes C, Prats E, Cairo J, Azorin F, Cornudella L, Godia F (1999) Modification of glucose and glutamine metabolism in hybridoma cells through metabolic engineering. *Cytotechnology* 30(1-3):85-93
- Raymond C, Robotham A, Spearman M, Butler M, Kelly J, Durocher Y Production of  $\alpha$ 2, 6-sialylated IgG1 in CHO cells. In: *MAbs*, 2015. vol 7. Taylor & Francis, p 571-583
- Rijcken WP, Overdijk B, Van den Eijnden D, Ferwerda W (1995) The effect of increasing nucleotide-sugar concentrations on the incorporation of sugars into glycoconjugates in rat hepatocytes. *Biochem J* 305(3):865-870
- Safina G, Duran Iu B, Alasel M, Danielsson B (2011) Surface plasmon resonance for real-time study of lectin-carbohydrate interactions for the differentiation and identification of glycoproteins. *Talanta* 84(5):1284-90 doi:10.1016/j.talanta.2011.01.030
- Schell JC, Rutter J (2013) The long and winding road to the mitochondrial pyruvate carrier. *Cancer Metab* 1(1):6 doi:10.1186/2049-3002-1-6
- Sellers K, Fox MP, Bousamra M, Slone SP, Higashi RM, Miller DM, Wang Y, Yan J, Yuneva MO, Deshpande R (2015) Pyruvate carboxylase is critical for non-small-cell lung cancer proliferation. *J Clin Invest* 125(2):687-698
- Sinclair AM, Elliott S (2005) Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. *J Pharm Sci* 94(8):1626-35 doi:10.1002/jps.20319
- Sola RJ, Griebenow K (2010) Glycosylation of therapeutic proteins: an effective strategy to optimize efficacy. *Biodrugs* 24(1):9-21 doi:10.2165/11530550-000000000-00000
- Swiech K, Picanco-Castro V, Covas DT (2012) Human cells: new platform for recombinant therapeutic protein production. *Protein Expr Purif* 84(1):147-53 doi:10.1016/j.pep.2012.04.023

- Toussaint C, Henry O, Durocher Y (2016) Metabolic engineering of CHO cells to alter lactate metabolism during fed-batch cultures. *J Biotechnol* 217:122-31 doi:10.1016/j.jbiotec.2015.11.010
- Vallee C, Durocher Y, Henry O (2014) Exploiting the metabolism of PYC expressing HEK293 cells in fed-batch cultures. *J Biotechnol* 169:63-70 doi:10.1016/j.jbiotec.2013.11.002
- Wong DC, Wong NS, Goh JS, May LM, Yap MG (2010a) Profiling of N-glycosylation gene expression in CHO cell fed-batch cultures. *Biotechnol Bioeng* 107(3):516-28 doi:10.1002/bit.22828
- Wong NS, Wati L, Nissom PM, Feng HT, Lee MM, Yap MG (2010b) An investigation of intracellular glycosylation activities in CHO cells: effects of nucleotide sugar precursor feeding. *Biotechnol Bioeng* 107(2):321-36 doi:10.1002/bit.22812
- Wong NS, Yap MG, Wang DI (2006) Enhancing recombinant glycoprotein sialylation through CMP-sialic acid transporter over expression in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 93(5):1005-1016
- Yang M, Butler M (2000) Effects of ammonia on CHO cell growth, erythropoietin production, and glycosylation. *Biotechnol Bioeng* 68(4):370-80
- Zagari F, Jordan M, Stettler M, Broly H, Wurm FM (2013) Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity. *N Biotechnol* 30(2):238-45 doi:10.1016/j.nbt.2012.05.021
- Zhang F, Sun X, Yi X, Zhang Y (2006) Metabolic characteristics of recombinant Chinese hamster ovary cells expressing glutamine synthetase in presence and absence of glutamine. *Cytotechnology* 51(1):21-8 doi:10.1007/s10616-006-9010-y
- Zhou M, Crawford Y, Ng D, Tung J, Pynn AF, Meier A, Yuk IH, Vijayasankaran N, Leach K, Joly J, Snedecor B, Shen A (2011) Decreasing lactate level and increasing antibody production in Chinese Hamster Ovary cells (CHO) by reducing the expression of lactate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinases. *J Biotechnol* 153(1-2):27-34 doi:10.1016/j.jbiotec.2011.03.003

## CHAPITRE 6    ARTICLE 3: ENHANCING GLYCOPROTEIN PRODUCTION BY THE CONCOMITANT REDUCTION OF LACTATE AND AMMONIA ACCUMULATION IN GLUTAMINE-FREE FED- BATCH CULTURES

Eric Karengera, Anna Robotham, John Kelly, Yves Durocher, Gregory De Crescenzo and Olivier  
Henry

### 6.1 Présentation de l'article

Cette section présente l'article « *Enhancing glycoprotein production yield and quality by the concomitant reduction of lactate and ammonia accumulation in glutamine-free fed-batch cultures* ». Cet article a été soumis à la revue *Biotechnology Journal*.

Les travaux précédents nous ont démontré qu'il est possible de réduire simultanément l'accumulation du lactate et de l'ammonium dans les cultures de cellules PYC2 en substituant la glutamine par le pyruvate. Cela a pour conséquence une amélioration importante de la production d'interféron  $\alpha 2b$ . De plus, l'alimentation en glucose et en pyruvate associée à des précurseurs de la sialylation permet de maintenir une bonne qualité de la protéine recombinante. Ces travaux ont également permis de mettre en évidence la capacité des cellules PYC2 à avoir une croissance maintenue ainsi qu'une productivité en IFN $\alpha 2b$  améliorée lorsque ni la glutamine ni un substituant n'étaient présents dans la culture.

Cette dernière observation a motivé le développement de cultures en mode *fed-batch* de la lignée PYC2 en conditions sans glutamine. Pour cela, nous avons choisi d'alimenter les cultures avec du glucose à partir d'une solution nutritive complexe concentrée ne contenant pas de glutamine. Cette solution fut utilisée pour maintenir le glucose en haute concentration tout au long de la culture dans le but de soutenir la croissance, la production protéique ainsi que la qualité de l'interféron  $\alpha 2b$ . En culture en flacon, ne pas alimenter les cultures en glutamine a significativement amélioré la viabilité cellulaire ainsi que la production d'IFN $\alpha 2b$  sans impacter la densité cellulaire maximale atteinte. Des performances similaires ont été observées lorsque la stratégie a été transposée en culture en bioréacteur. L'analyse de la sialylation et de la glycosylation par SPR et par LC-MS a démontré que l'absence d'apport en glutamine n'a pas d'influence néfaste sur la qualité de l'IFN $\alpha 2b$ . Ces derniers travaux proposent donc une approche simple et attrayante

pour le développement de procédés *fed-batch* permettant la production de protéines recombinantes en haute concentration et de qualité optimale.

## **6.2 Enhancing glycoprotein production by the concomitant reduction of lactate and ammonia accumulation in glutamine-free fed-batch cultures.**

**Eric Karengera<sup>a</sup>, Anna Robotham<sup>b</sup>, John Kelly<sup>b</sup>, Yves Durocher<sup>c</sup>, Gregory De Crescenzo<sup>a</sup> and Olivier Henry<sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup> Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montréal (QC), Canada H3C 3A7

<sup>b</sup> Human Health Therapeutics Portfolio, National Research Council Canada, Ottawa, Canada

<sup>c</sup> Human Health Therapeutics Portfolio, National Research Council Canada, Montréal, Canada

\*Corresponding author: Olivier Henry at Chemical Engineering Department of École Polytechnique de Montréal, C.P. 6079, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3A7. Tel.: +1 514 340 4711 2191; fax: +1 514 340 4159.

E-mail address: [olivier.henry@polymtl.ca](mailto:olivier.henry@polymtl.ca)

### 6.2.1 Abstract

Lactate and ammonia accumulation is a major factor limiting the performance of fed-batch strategies for mammalian cell culture processes. In addition to the detrimental effects of these by-products on production yield, ammonia also contributes to recombinant glycoprotein quality deterioration. In this study, we tackled the accumulation of these two inhibiting metabolic wastes by culturing in glutamine-free fed-batch cultures an engineered HEK293 cell line displaying an improved central carbon metabolism. Batch cultures highlighted the ability of PYC2-overexpressing HEK293 cells to grow and sustain a relatively high viability in absence of glutamine without prior adaptation to the culture medium. In fed-batch cultures designed to maintain glucose at high concentration by daily feeding a glutamine-free concentrated nutrient feed, the maximum lactate and ammonia concentration did not exceed 5 mM and 1 mM, respectively. In flask, this resulted in more than a 2.5-fold increase in IFN $\alpha$ 2b titer in comparison to the control glutamine-supplied fed-batch. In bioreactor, this strategy led to similar reductions in lactate and ammonia accumulation and an increase in IFN $\alpha$ 2b production. Of utmost importance, this strategy did not affect IFN $\alpha$ 2b quality with respect to sialylation and glycoform distribution as confirmed by surface plasmon resonance biosensing and LC-MS, respectively. Our strategy thus offers an attractive and simple approach for the development of efficient cell culture processes for the mass production of high quality therapeutic glycoproteins

**Keywords:** Glutamine-free fed-batch, HEK293 cells, PYC2-overexpression, protein quality

## 6.2.2 Introduction

Mammalian cell lines are today's workhorse to produce recombinant therapeutic glycoproteins. Although they are characterized by a lower productivity by comparison to their bacterial and fungal counterparts, they possess the required machinery for human-like glycosylation, making these cells essential for the production of high-quality therapeutic glycoproteins (Zhu, 2012). While CHO cells are the most commonly used mammalian hosts in the biomanufacturing industry, they present potentially immunogenic glycosylation patterns that can pose a risk to the patient safety (Ghaderi, Taylor, Padler-Karavani, Diaz, & Varki, 2010; Noguchi, Mukuria, Suzuki, & Naiki, 1995). As an alternative, there is a growing interest for the use of human cell lines because they offer the prospect of generating glycosylation profiles even closer to those normally found in humans (Dumont, Euwart, Mei, Estes, & Kshirsagar, 2016; Fliedl, Grillari, & Grillari-Voglauer, 2015). Yet, glycosylation is very sensitive to several parameters such as the cell clone and the culture conditions (Hossler, Khattak, & Li, 2009). Heterogeneous populations of glycoforms that include non-glycosylated and differentially glycosylated versions of the recombinant protein are generally observed in the cultures. Among the factors impacting the recombinant protein production and quality, the accumulation of waste metabolites is one of the most important. While no deleterious effect of lactate on protein quality has yet been demonstrated, its accumulation must be countered to promote cell growth, culture viability and protein production. Ammonia on the other hand, in addition of being a well-known inhibitor of cell growth and productivity, has a widely recognized detrimental impact on protein glycosylation (Andersen & Goochee, 1995; Chen, P. & Harcum, 2006; Gawlitzek, M., Ryll, Lofgren, & Sliwowski, 2000; Gawlitzek, Martin, Valley, & Wagner, 1998). These two waste metabolites are more likely to accumulate and reach inhibitory levels in fed-batch processes, where culture duration is generally extended and key nutrients are steadily provided to the cells during the process. Metabolic engineering has provided different valuable approaches to tackle lactate accumulation, for instance via the reduction of the expression of the lactate dehydrogenase (Chen, K., Liu, Xie, Sharp, & Wang, 2001; Zhou et al., 2011) or via the overexpression of the pyruvate yeast carboxylase (PYC2) (Henry & Durocher, 2011; Irani, Noushin, Wirth, Manfred, van den Heuvel, Joop, & Wagner, Roland, 1999; Toussaint, Henry, & Durocher, 2016). The latter modification was shown to significantly improve the glucose utilization efficiency by redirecting a higher pyruvate amount

from glycolysis toward the tricarboxylic acid cycle (TCA), thereby reducing its availability for lactate generation (Irani, N., Wirth, M., van Den Heuvel, J., & Wagner, R., 1999).

In this work, we have investigated the effect of using PYC2-overexpressing HEK293 in a glutamine-free environment on culture performance. In batch cultures, we observed that PYC2 cells grew in glutamine-free media while maintaining a high viability and producing higher titers of interferon  $\alpha 2b$  (IFN $\alpha 2b$ ) in comparison to the glutamine-containing cultures. These characteristics were exploited in fed-batch culture: first in shake flasks, then in bioreactors. The volumetric productivity of the cultures and the quality of the recombinant IFN $\alpha 2b$  were evaluated and compared to the glutamine-fed cultures. Our study demonstrated that PYC2 cells can be advantageously employed to produce high-quality recombinant glycoproteins in simple and high-yielding fed-batch processes.

## **6.2.3 Materials and methods**

### **6.2.3.1 Cell lines**

The HEK293-F5 (PYC2) cell line, derived from the HEK293-D9 clone (parental), was stably transfected with a vector encoding for the yeast pyruvate carboxylase 2 gene (GeneID: 852519) as described by Henry and Durocher (2011). The HEK293-D9 clone stably producing IFN $\alpha 2b$  was established as described in Loignon et al. (2008) from the HEK293-6E clone expressing an EBNA1 protein of the Epstein-Barr virus (Loignon et al., 2008).

### **6.2.3.2 Batch and fed-batch cultures in shake flasks**

Cells were maintained in Freestyle F17 medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma) supplemented with 4 mM of glutamine (Sigma–Aldrich, St.Louis, MO), 0.1% Pluronic F-68 (Sigma–Aldrich, St.Louis, MO) and 0.3% anti-clumping agent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma). Maintenance cultures were passaged once every 2 days. Cultures in shake flasks were performed in duplicate. For batch and fed-batch cultures, the same medium, supplemented or not with 4 mM glutamine, was used. The integral of viable cell density (IVCD) was calculated (Sauer, Burky, Wesson, Sternard, & Qu, 2000) for the batch cultures of PYC2-overexpressing cells and their parental cells. For fed-batch cultures with and without glutamine, the feed consisted in the glutamine-free concentrated nutrient CHO CD EfficientFeed™ B (Thermo Fisher Scientific,



Waltham, Ma). Upon daily glucose concentration evaluation, starting at day 2, the concentrated feed solution was added to the culture to maintain the glucose level between 20 and 30 mM. Although the seed cultures were performed in glutamine-supplemented medium, no glutamine was initially present in the basal medium of the glutamine-free fed-batch cultures. The control cultures started with 4 mM of glutamine in the basal medium and, in addition to the concentrated feed nutrients, a concentrated glutamine solution (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) was added independently during the cultures to maintain its concentration at around 3 mM. Sampling of the culture medium was performed daily to evaluate cell density using a hemacytometer (Reichert, Buffalo, NY) and assess culture viability by trypan bleu exclusion. After centrifugation of the samples at  $2000 \times g$  for 5 min, the resulting clarified supernatants were stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for subsequent analysis.

#### **6.2.3.3 Fed-batch cultures in bioreactor**

Bioreactor cultures were performed in a Labfors 4 2L bioreactor (Infors HT Canada, Québec, QC) with a starting working volume of 0.5 L consisting in the same basal medium as that of the shake flasks cultures. Cultures were inoculated at a cell density of  $0.2 \times 10^6$  cells/mL and at an initial agitation speed of 75 RPM that was gradually increased along the experiment to avoid cells aggregation, until reaching a maximum of 130 RPM. The cultures were controlled at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  and at pH 7.0 using  $\text{CO}_2$  surface aeration and sodium hydroxide addition. Dissolved oxygen was controlled at 40 % of air saturation using a mixture of air, oxygen and nitrogen fed by surface aeration at 100 mL/min. Sampling was performed twice a day for glucose, lactate, glutamine and glutamate measurements and for viable cell density evaluation. Samples were centrifuged and the supernatants were kept at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Glucose and glutamine concentrations were evaluated daily to calculate the feed requirement so as to maintain their concentrations between 20-30 mM and 2-4 mM, respectively. Glucose was provided to the culture using the glutamine-free nutrient feed solution CHO CD EfficientFeed™ and glutamine was fed separately using a 200 mM glutamine concentrated solution. For the fed-batch cultures without glutamine, only the glutamine-free concentrated nutrient feed was provided to the cultures.

#### **6.2.3.4 Nutrient and metabolite analysis**

Glucose, lactate, glutamine and glutamate concentrations were evaluated using a YSI2700 SELECT Biochemistry Analyzer (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH). For

ammonia, the Ammonia Assay Kit (Sigma–Aldrich, St.Louis, MO) was used according to the manufacturer instructions.

#### **6.2.3.5 IFN $\alpha$ 2b purification**

IFN $\alpha$ 2b was purified from clarified supernatants by cation exchange chromatography using an Akta Explorer system (GE healthcare, Baie-d’Urfé, QC). The Tricorn™ Mono-S 10/100 GL column (GE healthcare, Baie-d’Urfé, QC) was equilibrated with a solution of 0.1 M Tri-Na citrate pH 3.5 containing 0.35 M NaCl. Then, 10 mL of supernatant diluted 3 times in the equilibration buffer solution was loaded into the column at a flow rate of 3 mL/min. After a washing step with the equilibration buffer, the elution was performed with a pH gradient from pH 3.5 to pH 6 using an elution buffer consisting of 0.1 M Tri-Na citrate pH 6 containing 0.35 M NaCl. The fraction containing the IFN $\alpha$ 2b was collected then desalted and buffer exchanged against water using a 3K centrifugal filter (Pall Corporation, Mississauga, ON).

#### **6.2.3.6 IFN $\alpha$ 2b quantification by Surface Plasmon Resonance biosensing**

A Biacore T100 biosensor (GE healthcare, Baie-d’Urfé, QC) was used for SPR experiments. A monoclonal anti-IFN $\alpha$ 2b antibody (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma) was immobilized on a CM5 chip using the standard amine coupling procedure. Briefly, the carboxymethylated groups on the CM5 chip were activated by the injection of equal volumes of 100 mM NHS and 400 mM EDC for 7 min at 5  $\mu$ L/min. Then the anti-IFN $\alpha$ 2b antibody at 50 mg/L in acetate buffer pH 5.0 was injected on the surface at the same flow rate for 10 min. The surfaces were blocked by injecting ethanolamine 1 M pH 8.0 at 5  $\mu$ L/min for 7 minutes. HBS-EP (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% v/v surfactant P20) (GE healthcare, Baie-d’Urfé, QC) was selected as running buffer for all the SPR experiments. To construct the calibration curve, serial dilutions of pure IFN $\alpha$ 2b of known concentration were injected for 60 s at 50  $\mu$ L/min on the prepared surfaces. The slope of the signal at 2 s after samples injections were plotted against IFN $\alpha$ 2b concentration. To quantify IFN $\alpha$ 2b from the cultures, clarified supernatants diluted 100 times in HBS-EP buffer were injected.

#### **6.2.3.7 Sialylation evaluation by SPR biosensing**

IFN $\alpha$ 2b sialylation was evaluated by SPR biosensing using the Sambucus nigra (SNA) lectin as ligand, as previously described (Karengera et al., 2017). Following the same procedure as for

the anti-IFN $\alpha$ 2b antibody, the SNA lectin at 50 mg/L in acetate buffer pH 5.0 was immobilized by amine coupling on a CM5 chip. Around 3700 RU of SNA were successfully immobilized on the surfaces. Pure IFN $\alpha$ 2b diluted in HBS-EP buffer at a concentration of 100 mg/L was injected on the surface containing the immobilized lectin. We tested the ability of the lectin to bind specifically to sialic acid on IFN $\alpha$ 2b. To this end, IFN $\alpha$ 2b samples at 100 mg/L presenting different sialylation levels were injected, in duplicate, on the surfaces harboring the immobilized SNA. The SPR sensorgrams showing the interactions between the SNA lectin and IFN $\alpha$ 2b were normalized to allow a direct comparison between the proteins from the different conditions. The stability of the SNA/ IFN $\alpha$ 2b complex was evaluated during the buffer injection phase (namely 180 s after the end of sample injection) by comparing the value of the normalized SPR signals at a given time point.

#### **6.2.3.8 Glycosylation analysis by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)**

Samples harvested at days 9 and 12 from the glutamine-supplemented fed-batch cultures and at days 12 and 16 from the glutamine-free cultures were purified by cation exchange chromatography. Then, the collected fractions were desalted and buffer-exchanged against water by filtration using 3K centrifugal filters (Pall Corporation, Mississauga, ON). 3 $\mu$ g of intact IFN $\alpha$ 2b protein were analyzed by LC-MS using the same procedure as described in Karengera et al. (2017) (Karengera et al., 2017).

### **6.2.4 Results**

#### **6.2.4.1 Glutamine-free batch cultures**

In batch cultures of the PYC2-overexpressing cells and the parental cells, the absence of glutamine led to a reduced growth rate and diminished maximum viable cell concentration (Figure 6.1-A). The integral of viable cell density (IVCD) from the cultures with and without glutamine was compared to assess the ability of the cells to grow in glutamine-free medium (Figure 6.1-B). Although the absence of glutamine led to more than a 50 % reduction of the IVCD in the parental cells cultures, it only had a minor impact on the IVCD of the PYC2 cells culture. Indeed, the IVCD of the PYC2 cells culture only decreased by 10 % under glutamine-free conditions.

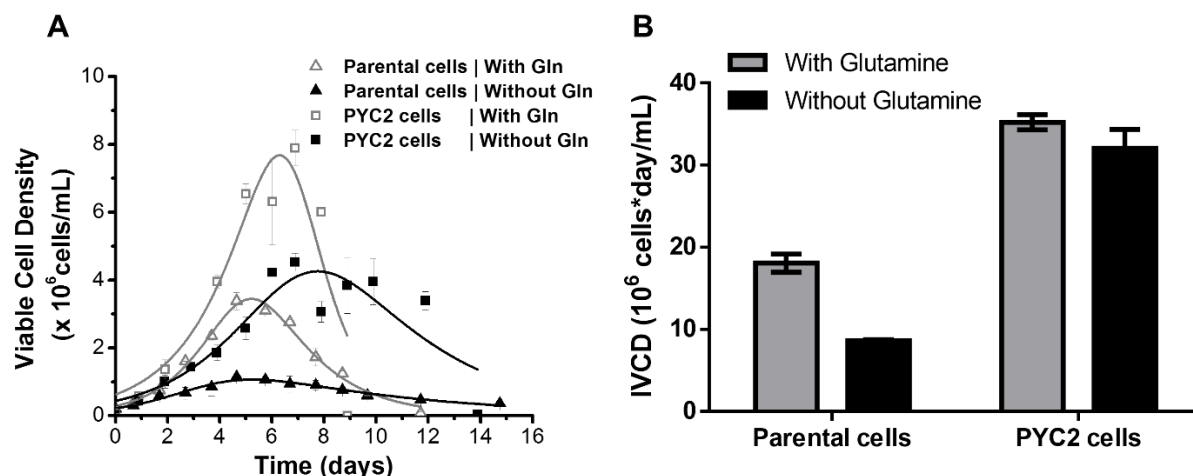


Figure 6.1 : Batch cultures of PYC2-overexpressing cells and the parental cells with and without glutamine. Time profiles of viable cell density (A) and comparison of the integral of viable cell density (IVCD, B).

#### 6.2.4.2 Fed-batch culture without glutamine in shake flasks

Since the growth of PYC2-overexpressing cells was not significantly impacted by the absence of glutamine in batch, small-scale glutamine-free fed-batch cultures were also performed. Since glucose availability is critical for consistent product glycosylation, the feeding strategy aimed at maintaining a high glucose concentration, namely around 20 mM by daily addition of a glutamine-free concentrated nutrient solution.

PYC2 cells in the glutamine-supplied fed-batch cultures demonstrated the highest growth rate and reached a maximum viable cell concentration of  $10 \times 10^6$  cells/mL (Figure 6.2-A). Surprisingly, the cell density profile of the glutamine-free cultures peaked almost at the same concentration. However, the significantly lower growth rate displayed by this culture delayed the two peaks of viable cell density by 4 days. This resulted in extended high viability conditions in the fed-batch culture without glutamine (Figure 6.2-B). As no prior media adaption was made, we observed a short lag phase due to the adaptation of the cells to the new culture conditions. Just like in batch culture, the absence of glutamine proved to be detrimental for the growth of parental cells in fed-batch cultures. Indeed, the maximum cell density achieved in the glutamine-free fed-batch

cultures of the parental cells was only  $2.5 \times 10^6$  cells/mL, which is 1.8-fold lower than the fed-batch culture with glutamine.

Glucose concentration was maintained between 13 mM and 38 mM during the fed-batch cultures (Figure 6.2-C). As expected, the parental cells cultures showed the highest maximum lactate concentration, reaching 19 mM and 17 mM in the cultures with and without glutamine, respectively. The absence of glutamine only had a marginal influence on the maximum lactate concentration, as both fed-batch cultures of the parental cells exhibited the same lactate concentration profile. However, an increased specific production of lactate was observed in conditions without glutamine. In sharp contrast, a significant decrease of maximum lactate concentration was noticed in the PYC2 cells fed-batch cultures without glutamine. Indeed, in this culture, lactate concentration peaked at 5 mM on day 2, a 2-fold reduction in comparison to the glutamine-supplied fed-batch culture, and then remained at around 2 mM until culture harvest. In the glutamine-supplemented cultures of PYC2 cells, a sharp increase in lactate concentration was observed after day 10. Since this coincided with the drop in culture viability, it could be attributed at least in part to the release of intracellular lactate from the cells undergoing lysis.

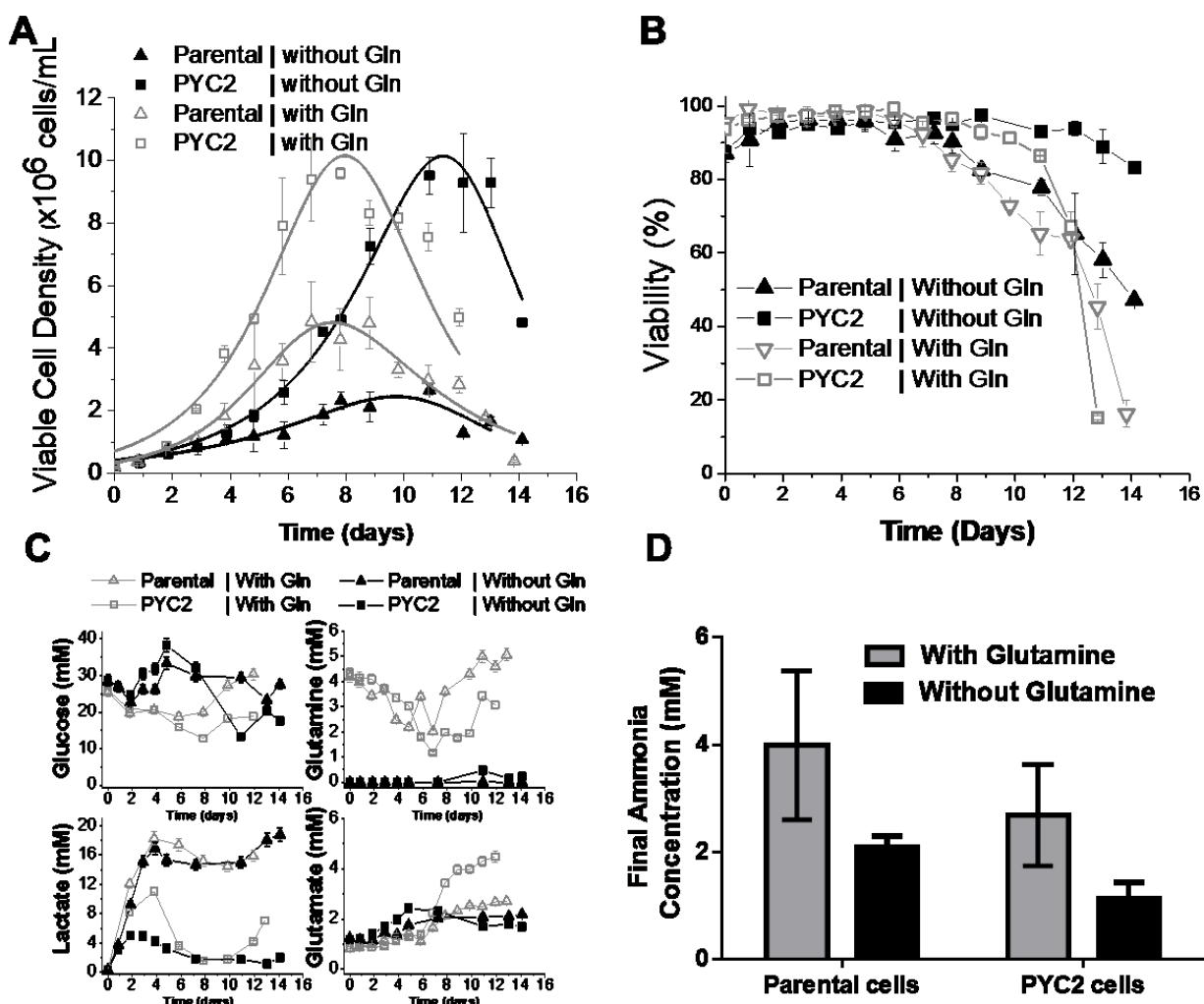


Figure 6.2: Fed-batch cultures in shake flasks with and without glutamine of PYC2-overexpressing cells and the parental cell clone. Starting on day 2, the cultures were fed with CHO CD EfficientFeed™ B based on the glucose consumption. In addition of the concentrated nutrient feed, glutamine was fed separately in the control cultures to keep its concentration between 2 mM and 4 mM. The time profiles of viable cell density (A) and viability (B). The time profiles of glucose, glutamine, lactate and glutamate (C). The final ammonia concentration (D). Error bars depict standard deviations of the measurements.

Our strategy proved effective at reducing the final ammonia concentration both in the parental and the PYC2 cells cultures (Figure 6.2-D). The maximum ammonia concentration reached 4 mM and was observed in the glutamine-fed cultures of the parental cells. This concentration was reduced by half when glutamine was not supplied in the parental cells fed-batch

cultures. In the fed-batch cultures of PYC2 cells, the absence of glutamine also drastically reduced ammonia concentration by 58% leading to a final ammonia concentration of circa 1 mM (Figure 6.2-D).

#### **6.2.4.3 Fed-batch cultures in bioreactor**

Bioreactor experiments were performed to assess the effectiveness of this strategy on a larger scale and under better controlled conditions (see Figure 6.3). Similar to what was observed in shake flasks experiments, the absence of glutamine also caused a longer lag phase in bioreactor culture, albeit to a lesser extent. However, contrarily to the cultures in shake flasks, the growth profiles and the maximum cell density were different between the glutamine supplemented and the glutamine-free conditions (Figure 6.3-A). In bioreactor experiments, glutamine-free cultures displayed 15% lower maximal viable cell density in comparison to the glutamine-supplemented culture. Nevertheless, the absence of glutamine greatly improved the viability and significantly extended the duration of the culture. Indeed, starting on day 8, a sharp drop of viability was observed in the glutamine-fed culture while for the glutamine-free culture it decreased steadily from day 10 until reaching 75 % at day 16 (Figure 6.3-B). While we observed a 50 % decrease in maximum lactate concentration in glutamine-free cultures in shake flask, a less important reduction was observed in bioreactor experiments (Figure 6.3-C). The maximum lactate concentration was reduced by 22 % when glutamine was not supplied in the fed-batch cultures in bioreactor. Moreover, after a phase of lactate consumption that started at day 6, we observed a second increase in lactate generation at day 10, which led to a final concentration of 15 mM at harvest. Glutamate concentration profiles in glutamine-free fed-batch cultures also showed a different trend when compared to the glutamine-fed cultures (see Figure 6.3-C). While in the glutamine-supplied cultures, the glutamate concentration remained constant, in the glutamine-free culture we observed a sudden increase on day 6 of the cultures. This was also observed in the shake flask experiments, but to a lower extent. As this was concomitant with the end of the exponential phase and the onset of the decrease of culture viability, this may be the result of a significant rewiring of cell metabolism or the release of intracellular glutamate by the lysed cells.

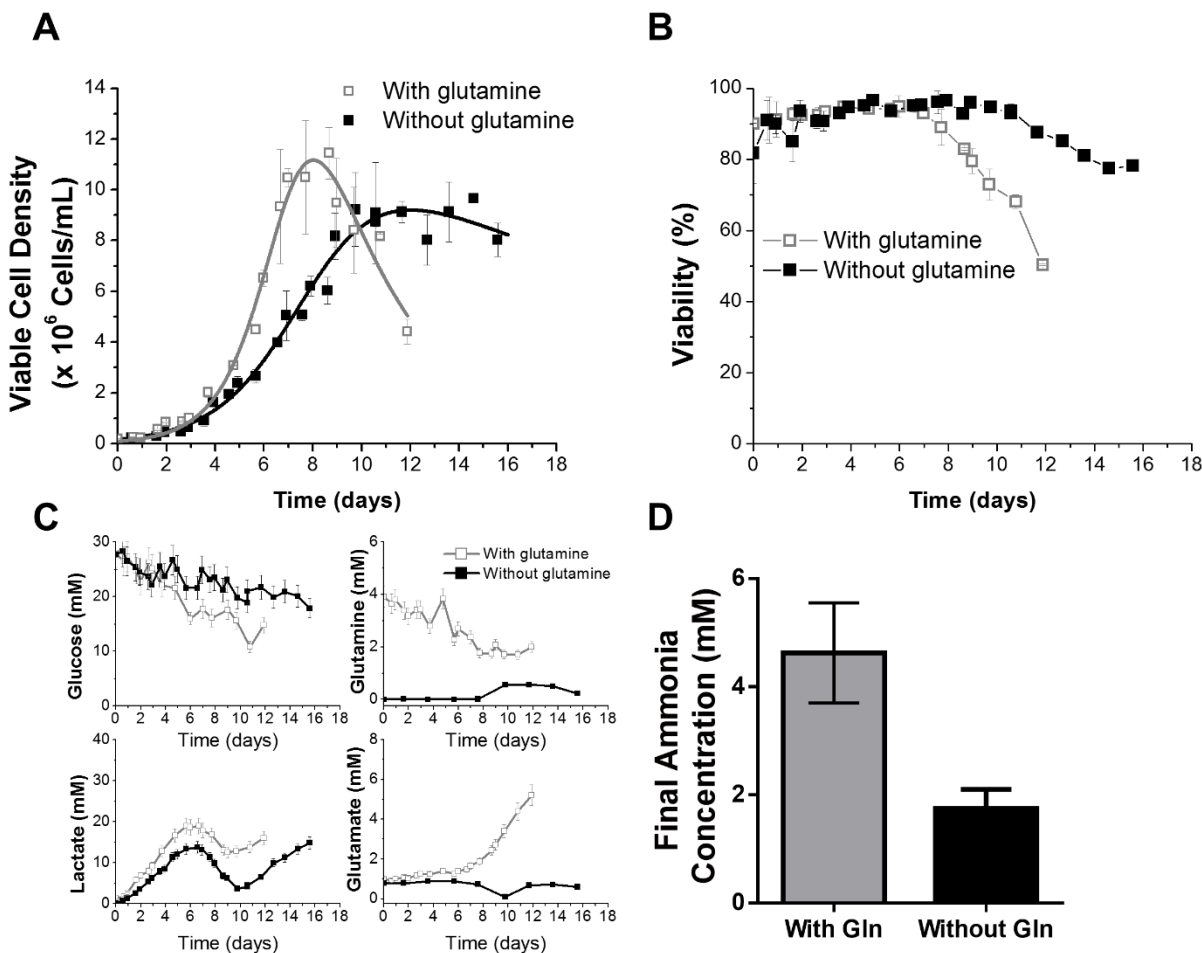


Figure 6.3: Fed-batch cultures of PYC2 cells in bioreactor conditions with glutamine and without glutamine. Time profiles of viable cell density (A) and viability (B). Time profiles of glucose, glutamine, lactate and glutamate concentration (C). Final ammonia concentration (D). Error bars depict standard deviations of the measurements.

The final ammonia concentrations observed in the bioreactor experiments are presented in Figure 6.3-D. In comparison to the shake flask experiments, culturing the PYC2 cells in bioreactor led to a slight increase in the final ammonia concentration. However, similarly to the observation in shake flask cultures, the glutamine-free fed-batch cultures of PYC2 cells in bioreactor exhibited a 60 % decrease in final ammonia concentration in comparison to the glutamine-fed cultures (Figure 6.3-D).



#### 6.2.4.4 Interferon $\alpha 2b$ production and quality

Waste metabolite accumulation has a major detrimental impact on recombinant protein production and glycosylation (Andersen & Goochee, 1995; Cruz, Freitas, Alves, Moreira, & Carrondo, 2000). In particular, ammonia accumulation in the culture environment is known to reduce glycoprotein sialylation (Yang & Butler, 2002). The improved carbon metabolism of PYC2 cells in glutamine-free fed-batch cultures allowed a drastic concomitant reduction in the generation of lactate and ammonia. We then evaluated the impact of this strategy on IFN $\alpha 2b$  production and quality. Final IFN $\alpha 2b$  concentration was greatly increased in glutamine-free fed-batch cultures of PYC2 cells in shake flasks (Figure 6.4-A). Indeed, protein titer in the glutamine-free cultures reached 498 mg/L, a 2.5-fold improvement compared to the concentration observed when glutamine was fed to the cultures. While an important decrease in lactate and ammonia production was also achieved in bioreactor, the enhancement of IFN $\alpha 2b$  production was less pronounced but still significant (34 % increase in final IFN $\alpha 2b$  titer). When compared with the shake flasks cultures, IFN $\alpha 2b$  production was increased in bioreactor, with the highest improvement observed for the glutamine-fed culture (Figure 6.4-A).

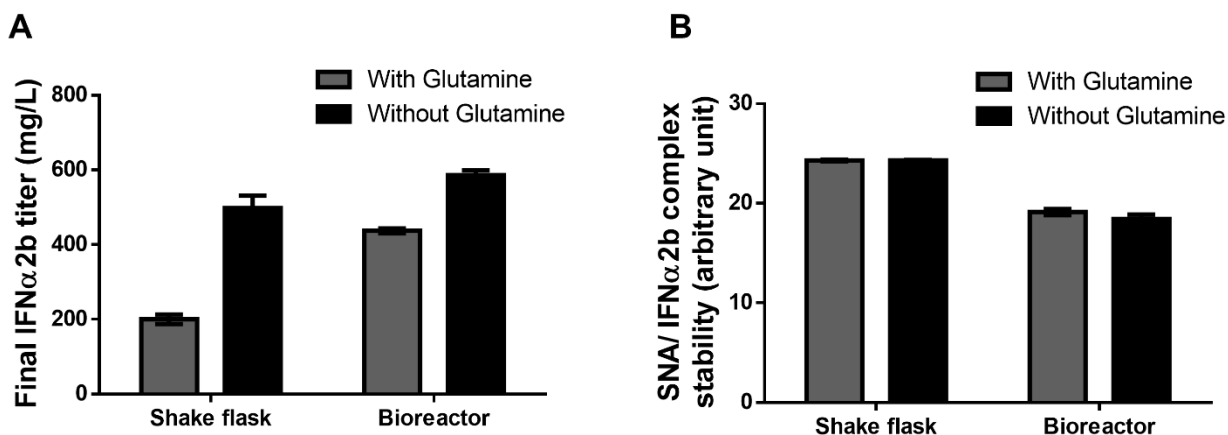


Figure 6.4: Quantification of final IFN $\alpha 2b$  concentration (A) and sialylation (B) in Fed-batch cultures with and without glutamine of PYC2-overexpressing cells and its parental cells. The Biacore™ T100 was used to analyze purified IFN $\alpha 2b$  from samples harvested at day 12 for the glutamine-fed culture and day 14 for the glutamine-free cultures in the shake flask experiments. For the bioreactor experiments the samples at day 12 and at day 16 were used for the glutamine-fed and the glutamine-free culture, respectively. An immobilized anti-IFN $\alpha 2b$  antibody was used

to quantify IFN $\alpha$ 2b (A). To analyze sialylation, purified IFN $\alpha$ 2b at 100 mg/L was injected on a CM5 chip on which SNA lectin had been immobilized. Sensorgrams were normalized and the levels of stably bound IFN $\alpha$ 2b (measured during the dissociation phase of the sensorgrams, namely 180 s after the end of sample injection) were used as an indication of the sialylation level of IFN $\alpha$ 2b. Analyses were performed in duplicate. Error bars denote measurements standard deviation.

The human IFN $\alpha$ 2b was used in our study as a model of therapeutic glycoprotein. With a molecular weight of around 19 kDa, IFN $\alpha$ 2b is O-glycosylated at one site (threonine 106) and sialylated (Adolf, Kalsner, Ahorn, Maurer-Fogy, & Cantell, 1991; Loignon et al., 2008). To get a rapid insight of the impact of the feeding strategy on IFN $\alpha$ 2b sialylation, we analyzed the interaction of purified IFN $\alpha$ 2b collected at harvest from the PYC2 cells cultures with the sialic acid specific lectin *Sambucus nigra* (SNA) (Figure 6.4-B). These experiments were performed by SPR biosensing. More specifically, we compared the percentage of SNA/ IFN $\alpha$ 2b complexes remaining on the biosensor surface while injecting buffer on the SNA/ IFN $\alpha$ 2b complexes. Our control experiments performed with preparations of IFN $\alpha$ 2b harboring different degrees of sialylation indicated that the shape of the normalized SNA-IFN $\alpha$ 2b sensorgram is a signature of a given IFN $\alpha$ 2b sialylation pattern while the SNA/ IFN $\alpha$ 2b complex stability is linked to the level of sialylated IFN $\alpha$ 2b (see Annexe C, page 180). The stability of the SNA/IFN $\alpha$ 2b interaction was similar when comparing the glutamine-fed and the glutamine-free fed-batch cultures, strongly suggesting that the absence of glutamine did not significantly impact IFN $\alpha$ 2b sialylation (Figure 6.4-B). However, we observed a reduction in the SNA/ IFN $\alpha$ 2b complex stability (and thus sialylation) when culturing the cells in bioreactors compared to the shake flasks experiments (Figure 6.4-B). This could be attributed to the higher accumulation of metabolic waste observed in the bioreactor experiment.

IFN $\alpha$ 2b samples collected at different time points of the fed-batch cultures in bioreactor were purified by cation exchange chromatography and then analyzed by LC-MS (see Figure 6.5). For both fed-batch strategies, we chose to analyze IFN $\alpha$ 2b samples collected at harvest and IFN $\alpha$ 2b samples collected when higher culture viability conditions were prevailing, namely on day 9 for the glutamine-supplemented cultures and day 12 for the glutamine-free cultures (Figure 6.5). Our results showed that, regardless of the culture conditions (with or without glutamine), the most abundant IFN $\alpha$ 2b glycoforms found in the cultures are the core type-1 disialylated O-glycan and

most probably the core type-2 disialylated O-glycan. This is in accordance with previous characterization of IFN $\alpha$ 2b produced in human cells (Loignon et al., 2008; Nyman, Kalkkinen, Tölö, & Helin, 1998). With time, we observed for both feeding strategies a decrease of the relative abundance of the core type-2 disialylated O-glycan as well as the appearance of less glycosylated glycoforms of IFN $\alpha$ 2b. In excellent agreement with the aforementioned SPR assay, no important differences in the protein sialylation was noticeable when comparing the spectra of IFN $\alpha$ 2b collected at harvest of the culture, namely at day 12 from the glutamine-supplemented culture and at day 16 from the glutamine-free culture. Nevertheless, while the two most abundant glycoforms are present at approximately the same levels, a minor difference is observable when comparing the relative abundance of the type-1 monosialylated O-glycoform. Indeed, this glycoform is 3-fold more present in the glutamine-free culture. However, this slight difference did not seem to account for a significant difference when comparing the IFN $\alpha$ 2b/SNA interaction by SPR. The SNA lectin is widely used for the study of  $\alpha$ 2,6-linked sialylation because of its good specificity (Lin et al., 2015; Shibuya et al., 1987; Yin et al., 2015). Just like other lectins, the interaction of SNA with a given glycoform is enhanced by the amount of the target residue on the glycans structure (Lundquist & Toone, 2002). This might explain that the two disialylated glycoforms of IFN $\alpha$ 2b, found in approximately the same proportion in both culture conditions, contributed more for the interaction with the SNA lectin. With a relative abundance lower than 10 %, a non-sialylated IFN $\alpha$ 2b glycoform was found in both culture conditions in the samples collected at harvest. Nonetheless, as also observed in our previous study (Karengera et al., 2017), most of the IFN $\alpha$ 2b glycoforms found in our bioreactor experiments were extensively sialylated. When comparing the IFN $\alpha$ 2b collected at day 12 of the cultures, we observed that the type-2 disialylated glycoform is more abundant in the glutamine-free culture. However, at day 9 in the glutamine-supplemented culture, the type-2 disialylated IFN $\alpha$ 2b was the most abundant glycoform and represented with the type-1 disialylated glycoform, the major isoforms of the protein. We can hypothesize that in the early phase of the cultures, the production of type-2 disialylated IFN $\alpha$ 2b may be promoted. This could be the result of the metabolic state of the cells combined to more favorable environmental conditions, i.e., lower metabolic by-products.

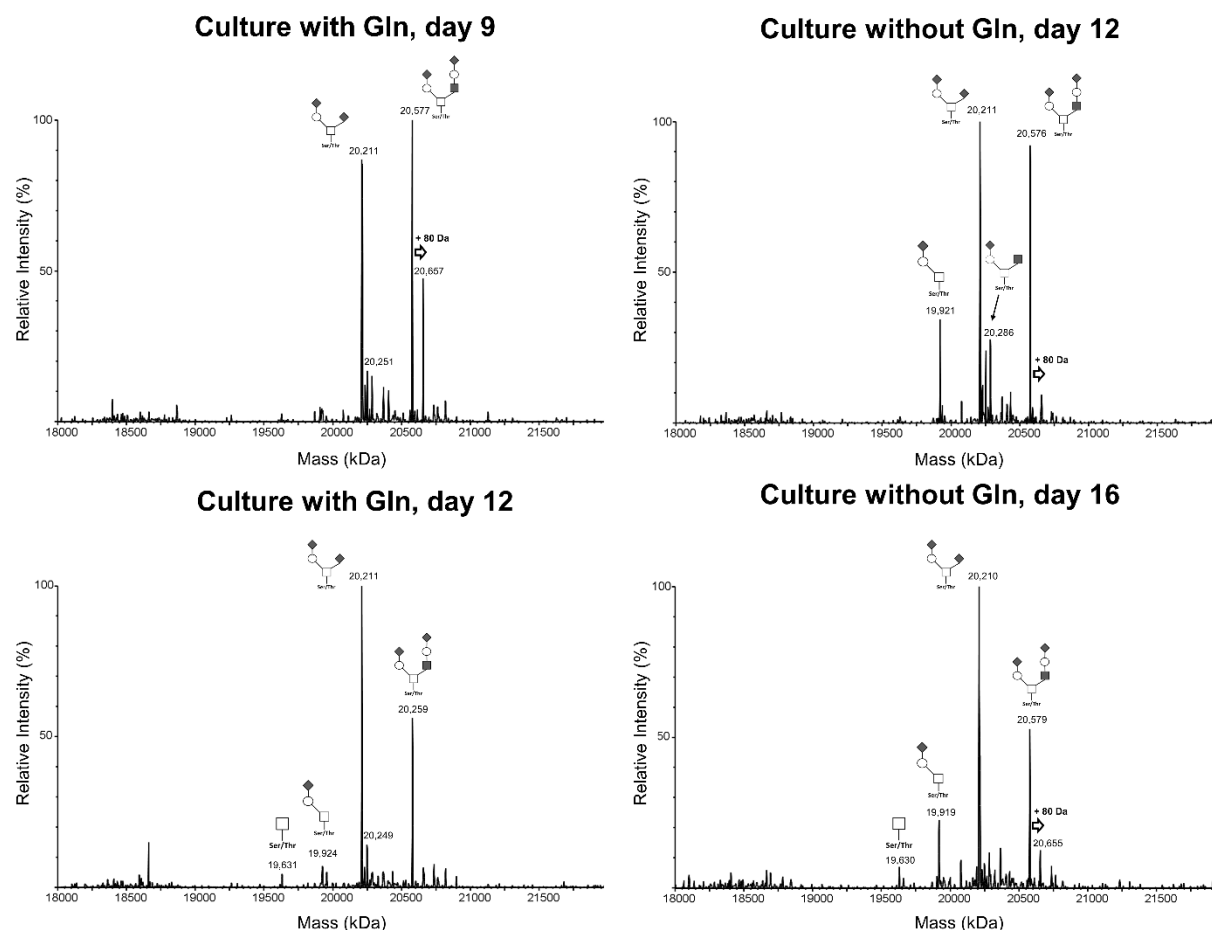


Figure 6.5: LC-MS analysis of IFN $\alpha$ 2b produced by PYC2-overexpressing cells in fed-batch cultures with and without glutamine. IFN $\alpha$ 2b samples were collected when high viability conditions were prevailing (day 9 and day 12 for glutamine-supplemented and glutamine-free cultures, respectively) and at harvest of the cultures (day 12 and day 16 for glutamine-supplemented and glutamine-free cultures, respectively).

Interestingly, the LC-MS spectrum of IFN $\alpha$ 2b collected at day 9 of the glutamine-supplemented fed-batch culture showed a relatively high peak corresponding to the type-2 disialylated IFN $\alpha$ 2b glycoform + 80 Da. Smaller similar peaks were also detected in the samples of IFN $\alpha$ 2b from the glutamine-free cultures. While more extensive analysis is required to confirm the nature of these glycoforms, they may be evidence of phosphorylations or sulfation. It is important to note that identification was based solely on mass. More extensive analysis would be required to assign unequivocally the carbohydrate composition of the observed glycoforms.

In summary, cultivating PYC2 cells in glutamine-free conditions using a concentrated nutrient feed led to sustained cell growth and extended high viability conditions because of drastic reduction in ammonia and lactate accumulation. This translated into significant improvement in IFN $\alpha$ 2b production in shake flasks and bioreactor cultures. Moreover, as evaluated by assaying the interaction of the SNA lectin with IFN $\alpha$ 2b and by LC-MS analysis, these performances were obtained without altering protein glycosylation.

## 6.2.5 Discussion

### 6.2.5.1 Cell kinetics and recombinant protein production

Together with glucose, glutamine is a major energy source for mammalian cells in culture. It is a pivotal molecule for nitrogen supply and acts as a key source for the anaplerotic reactions. The generally very low endogenous glutamine synthetase activity makes cultivated mammalian cells very dependent on external glutamine supply. Besides, glutamine deprivation has shown to induce autophagy in human and CHO cells, which can lead to decreased productivity (Jardon et al., 2012; Shanware et al., 2014). On the other hand, glucose and glutamine are inefficiently metabolized in cultivated mammalian cell lines, leading to the accumulation of toxic metabolic by-products. Therefore, to promote cell growth and high recombinant protein titer, the accumulation of metabolic wastes in cultures, particularly lactate and ammonia, should be kept at minimum levels. Ammonia, especially, is known to have deleterious effects, even at low concentrations (Andersen & Goochee, 1995). Different strategies to reduce its buildup have proven successful to various degrees and range from cell engineering strategies like the overexpression of glutamine synthetase (Paredes et al., 1999; Zhang, Sun, Yi, & Zhang, 2006), the use of glutamine substitutes (Christie & Butler, 1994; Ha & Lee, 2014) and fed-batch processes maintaining low residual glutamine concentrations (Chee Fung Wong, Tin Kam Wong, Tang Goh, Kiat Heng, & Gek Sim Yap, 2005; Lee, Yap, Hu, & Wong, 2003; Maranga & Goochee, 2006). While the latter is effective at reducing ammonia accumulation, keeping low glutamine concentration in fed-batch cultures may be difficult to implement at industrial scales (Kim do et al., 2013). In the present study, we demonstrated that the metabolism of the PYC2 cells allow them to cope with the absence of glutamine and to have a sustained cellular growth and significantly enhanced production of high-quality IFN $\alpha$ 2b.

While PYC2-overexpression improves the glucose metabolism in mammalian cells by reducing the lactate-to-glucose ratio, ammonia accumulation may still pose a problem, especially in glutamine-supplied fed-batch cultures (Toussaint et al., 2016; Vallée, Durocher, & Henry, 2014). Here, we observed that in addition to a decreased ammonia accumulation, the absence of glutamine led to a further reduction of the maximum lactate concentration. Indeed, in glutamine-free fed-batch cultures of the PYC2 cells, the maximum lactate concentration was reduced in shake flasks and bioreactor, albeit to a lesser extent in the latter. Various observations have been made in the literature about the lactate metabolism in glutamine-free conditions. For example, a reduction of lactate production was observed by Burleigh et al. in a glutamine-free batch culture of CHO cells (Burleigh et al., 2011). In contrast, no change in the maximum lactate concentration was observed by Taschwer et al. when culturing a glutamine-free adapted CHO cell line (Taschwer et al., 2012). In another study, Zagari et al. have related the lactate consumption by CHO cells to the diminution of glutamine concentration in the medium (Zagari, Jordan, Stettler, Broly, & Wurm, 2013). In cultures of growth-arrested HEK293 cells, Rajendra et al. observed a significant increase in lactate production in glutamine-free conditions (Rajendra, Kiseljak, Baldi, Hacker, & Wurm, 2012). In this same study, this observation contrasted with the culture of growth-arrested CHO cells which experienced a reduced maximal lactate concentration under similar conditions. Taken together, these results imply that the effect of glutamine removal on the lactate metabolism may be strongly dependent on the cell line and the culture conditions.

The glutamine-free fed-batch cultures of PYC2-overexpressing cells demonstrated a sustained cellular growth, albeit with a short lag phase. This contrast with most studies in which the absence of glutamine, or very low glutamine concentrations, led to hindered cell growth, especially when no prior media adaptation step was performed (Bort, Stern, & Borth, 2010; Chee Fung Wong et al., 2005). Nadeau et al. reported that HEK293 cells adapt to very low glutamine concentrations by increasing the metabolic fluxes of essential amino acids towards the TCA. However, these enhanced fluxes were not sufficient for providing the energy required for optimal cell growth (Nadeau, Sabatie, Koehl, Perrier, & Kamen, 2000). On the other hand, studies have shown that several human cancer cells can rely mainly on the pyruvate carboxylase activity (and not glutaminolysis) to fuel the TCA and ensure their proliferation (Sellers et al., 2015). This is a mechanism by which cells could become completely independent from glutamine (Cheng et al., 2011).

As a consequence of lower lactate and ammonia accumulation, the IFN $\alpha$ 2b titer was increased by 2-fold in glutamine-free fed-batch cultures of the PYC2 cells in shake flasks. Some authors have observed a significant increase in recombinant protein titer when culturing cells in low glutamine media. For instance, Chee Fung Wong et al. improved IFN- $\gamma$  yield by 10-fold by controlling the glutamine concentration at 0.3 mM in CHO cells cultures (Chee Fung Wong et al., 2005). However, only a few studies have reported improved recombinant protein production by a non-adapted or a non-GS mammalian cell line under glutamine-free conditions. For instance, Rajendra et al. observed increased recombinant protein production in glutamine-free CHO and HEK293 cells cultures. However, the authors made this observation with cells that were growth-arrested by means of temperature reduction (for the CHO cells) or valproic acid treatment (for the HEK293 cells) (Rajendra et al., 2012). Nonetheless, their observation implies that the absence of glutamine during the production phase of the culture, which is generally characterized by lower cellular growth, may be beneficial for recombinant protein production.

It is noteworthy that some cultivated human cells such as PER.C6 and HEK293 cells have shown good tolerance to very low glutamine concentrations (Lee et al., 2003; Maranga & Goochee, 2006; Nadeau et al., 2000). It was therefore suggested that extracellular glutamine plays a relatively minor role in the energy metabolism of these cell lines (Maranga & Goochee, 2006). Recently, the work of Da Young Yu et al. (2016), showed that the endogenous glutamine synthetase activity in HEK293 cells is nearly 5 times more important than that in CHO cells (Noh & Lee, 2016). Despite this fact, as demonstrated by the glutamine-free parental cell cultures in our study, this non-metabolically engineered HEK293 cell line was unable to grow successfully in glutamine-deprived environment. Most probably, the improved performances observed in PYC2 cells cultures resulted, at least in part, from the combination of these two advantageous characteristics, namely a relative tolerance to glutamine-free environment combined to an improved central carbon metabolism that does not cause significant lactate accumulation.

#### **6.2.5.2 Interferon $\alpha$ 2b quality**

Ensuring high and consistent protein quality is of paramount importance in the development of a biotherapeutic production process. Due to its crucial influence on the biotherapeutic potency as well as on the patient safety, recombinant protein glycosylation is considered a critical quality attribute (Sinclair & Elliott, 2005). More specifically, protein sialylation has a considerable

influence on the half-life of the biotherapeutic in the serum (Erbayraktar et al., 2003; Morell, Gregoriadis, Scheinberg, Hickman, & Ashwell, 1971). For this reason, it is important to ensure that the strategies developed to improve recombinant protein production yield promote the maintenance or even increase product quality. Moreover, the metabolism of glucose and glutamine have shown to influence recombinant protein quality (Burleigh et al., 2011; Liu et al., 2014), it was important to evaluate the effect of the adopted strategies on product glycosylation.

During the cultures, recombinant glycoprotein quality can be altered by several factors comprising glucose availability, ammonia accumulation and the release of sialidases, particularly during the death phase (Andersen & Goochee, 1995; Chuan et al., 2006; Yang & Butler, 2000). Ammonia accumulation during mammalian cell cultures has shown to alter recombinant protein glycosylation by leading to decreased site occupancy, increased glycans antennarity and reduced sialylation (Aghamohseni et al., 2014; Gawlitzek, Martin et al., 1998; Ryll, Valley, & Wagner, 1994; Valley, Nimtz, Conradt, & Wagner, 1999; Yang & Butler, 2000). On the other hand, by participating in the rate-limiting step of the hexosamine biosynthesis pathway, glutamine represents a key molecule linking the glucose metabolism to the synthesis of glycosylation precursors (Wellen et al., 2010; Willems, van Engelen, & Lefeber, 2016). The absence of this amino acid in the culture medium may therefore have an impact on protein glycosylation. However, various observations have been made in the literature. Under glutamine-deprived conditions in continuous cultures of CHO cells producing the human chorionic gonadotrophin (HCG), Burleigh et al. noted a decreased glycolytic flux correlated with a reduction in intracellular uridine diphosphate N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) and in the antennarity and the sialylation of HCG (Burleigh et al., 2011). However, in this study, glucose was maintained at very low levels, which could have amplified the influence of glutamine on glycosylation. On the other hand, Taschwer et al. reported an unchanged glycosylation profile for an erythropoietin-Fc fusion protein when comparing a CHO cell line adapted to glutamine-free conditions and its parental cells cultured in glutamine-supplemented medium (Taschwer et al., 2012). As observed in the study of Burleigh et al., the lack of glutamine induces metabolic changes leading to an increased conversion of  $\alpha$ -ketoglutarate to glutamate and ultimately to glutamine (Burleigh et al., 2011). Moreover, several other studies have reported an increase in glutamate uptake and in the consumption of essential amino acids upon glutamine deprivation (Maranga & Goochee, 2006; McDermott & Butler, 1993; Nadeau et al., 2000). Hence, in the study of Wong et al. (2010), very low glutamine concentrations



(ranging from 0.1 mM to 0.3 mM) were shown to downregulate the expression of sialylation-related genes leading to decreased recombinant glycoprotein sialylation (Wong, Wong, Goh, May, & Yap, 2010). Besides, such very low glutamine concentrations also caused the reduction of the expression of intracellular and cytosolic sialidases (Wong et al., 2010), which could be beneficial for protein sialylation. Altogether, the influence of ammonia accumulation, culture viability and glutamine deprivation on protein quality constitute several factors that may have played a role in our fed-batch cultures and their balance resulted in very similar final IFN $\alpha$ 2b sialylation.

When comparing the distribution of IFN $\alpha$ 2b glycoforms from the samples collected at harvest of the fed-batch cultures in bioreactor with and without glutamine, very similar glycosylation profiles were observed. Moreover, we observed that the main IFN $\alpha$ 2b glycoforms resulting from cultures with both feeding strategies were extensively sialylated. Considering the important role of glutamine in the synthesis of glycosylation precursors, this suggests that the PYC2 cells succeeded maintaining high IFN $\alpha$ 2b glycosylation by producing minimal glutamine concentration. Indeed, as noted earlier, this can be supported by the observation that the endogenous GS activity in HEK293 cells was shown to be higher by comparison to CHO cells (Noh & Lee, 2016). Moreover, a study involving glioblastoma cells have shown that under glutamine deprivation, the cells can rely on endogenous GS activity to sustain the biosynthesis of nucleotides (Tardito et al., 2015). These nucleotides could then be used for the generation of glycosylation precursors, the nucleotide-sugars. This could explain, at least in part, the maintenance of high quality IFN $\alpha$ 2b in the glutamine-free fed-batch culture.

Since the glutamine-supplemented culture had a higher final ammonia concentration, one might have expected more difference in the product glycosylation profile. This may suggest that, at the observed concentration (4-5 mM), considering the culture conditions, the cell line and the recombinant protein produced, ammonia did not have an important detrimental influence on IFN $\alpha$ 2b glycosylation.

With this study, we demonstrate that the PYC2 metabolism can be further exploited to mitigate ammonia accumulation. Using a production medium and feeding a concentrated nutrient solution both deprived of glutamine resulted in significant titers improvement because of dramatic concomitant lactate and ammonia reduction. Despite the critical role of glutamine in the biosynthesis of key precursors, this strategy did not alter product quality, as we observed a highly

similar glycosylation profile of the IFN $\alpha$ 2b collected at harvest of the cultures. Comprehensive metabolic flux analysis conducted in parallel with the quantification of the intracellular concentration of nucleotide sugars should provide further understanding in the way PYC2 cells adapt to glutamine-free conditions.

### **6.2.6 Acknowledgements**

The authors would like to thank Prof. Mario Jolicoeur for granting access to the bioreactors used in this study.

This work was supported by Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies (FRQNT, grant number 175187). Eric Karengera received a scholarship from Wallonia-Brussels International (WBI). This is NRC publication NRC-HHT\_#####.

## 6.2.7 References

- Adolf, G. R., Kalsner, I., Ahorn, H., Maurer-Fogy, I., & Cantell, K. (1991). Natural human interferon- $\alpha$ 2 is O-glycosylated. *Biochemical Journal*, 276(2), 511-518.
- Aghamohseni, H., Ohadi, K., Spearman, M., Krahn, N., Moo-Young, M., Scharer, J. M., . . . Budman, H. M. (2014). Effects of nutrient levels and average culture pH on the glycosylation pattern of camelid-humanized monoclonal antibody. *J Biotechnol*, 186, 98-109. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.05.024
- Andersen, D. C., & Goochee, C. F. (1995). The effect of ammonia on the O-linked glycosylation of granulocyte colony-stimulating factor produced by chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng*, 47(1), 96-105. doi:10.1002/bit.260470112
- Bort, J. A. H., Stern, B., & Borth, N. (2010). CHO-K1 host cells adapted to growth in glutamine free medium by FACS-assisted evolution. *Biotechnology journal*, 5(10), 1090.
- Burleigh, S. C., van de Laar, T., Stroop, C. J., van Grunsven, W. M., O'Donoghue, N., Rudd, P. M., & Davey, G. P. (2011). Synergizing metabolic flux analysis and nucleotide sugar metabolism to understand the control of glycosylation of recombinant protein in CHO cells. *BMC Biotechnol*, 11(1), 95. doi:10.1186/1472-6750-11-95
- Chee Fung Wong, D., Tin Kam Wong, K., Tang Goh, L., Kiat Heng, C., & Gek Sim Yap, M. (2005). Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation quality in CHO cell cultures. *Biotechnol Bioeng*, 89(2), 164-177. doi:10.1002/bit.20317
- Chen, K., Liu, Q., Xie, L., Sharp, P. A., & Wang, D. I. (2001). Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production. *Biotechnol Bioeng*, 72(1), 55-61. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11084594>
- Chen, P., & Harcum, S. W. (2006). Effects of elevated ammonium on glycosylation gene expression in CHO cells. *Metabolic engineering*, 8(2), 123-132.
- Cheng, T., Sudderth, J., Yang, C., Mullen, A. R., Jin, E. S., Matés, J. M., & DeBerardinis, R. J. (2011). Pyruvate carboxylase is required for glutamine-independent growth of tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(21), 8674-8679.

- Christie, A., & Butler, M. (1994). Glutamine-based dipeptides are utilized in mammalian cell culture by extracellular hydrolysis catalyzed by a specific peptidase. *J Biotechnol*, 37(3), 277-290. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7765576>
- Chuan, K. H., Lim, S. F., Martin, L., Yun, C. Y., Loh, S. O., Lasne, F., & Song, Z. (2006). Caspase activation, sialidase release and changes in sialylation pattern of recombinant human erythropoietin produced by CHO cells in batch and fed-batch cultures. *Cytotechnology*, 51(2), 67-79. doi:10.1007/s10616-006-9016-5
- Cruz, H. J., Freitas, C. M., Alves, P. M., Moreira, J. L., & Carrondo, M. J. (2000). Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. *Enzyme Microb Technol*, 27(1-2), 43-52. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10862901>
- Dumont, J., Euwart, D., Mei, B., Estes, S., & Kshirsagar, R. (2016). Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit Rev Biotechnol*, 36(6), 1110-1122. doi:10.3109/07388551.2015.1084266
- Erbayraktar, S., Grasso, G., Sfacteria, A., Xie, Q.-w., Coleman, T., Kreilgaard, M., . . . Gokmen, N. (2003). Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(11), 6741-6746.
- Fliedl, L., Grillari, J., & Grillari-Voglauer, R. (2015). Human cell lines for the production of recombinant proteins: on the horizon. *New biotechnology*, 32(6), 673-679.
- Gawlitsek, M., Ryll, T., Lofgren, J., & Sliwowski, M. B. (2000). Ammonium alters N-glycan structures of recombinant TNFR-IgG: degradative versus biosynthetic mechanisms. *Biotechnol Bioeng*, 68(6), 637-646. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10799988>
- Gawlitsek, M., Valley, U., & Wagner, R. (1998). Ammonium ion and glucosamine dependent increases of oligosaccharide complexity in recombinant glycoproteins secreted from cultivated BHK-21 cells. *Biotechnology and bioengineering*, 57(5), 518-528.
- Ghaderi, D., Taylor, R. E., Padler-Karavani, V., Diaz, S., & Varki, A. (2010). Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins. *Nat Biotechnol*, 28(8), 863-867. doi:10.1038/nbt.1651

- Ha, T. K., & Lee, G. M. (2014). Effect of glutamine substitution by TCA cycle intermediates on the production and sialylation of Fc-fusion protein in Chinese hamster ovary cell culture. *J Biotechnol*, 180, 23-29. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.04.002
- Henry, O., & Durocher, Y. (2011). Enhanced glycoprotein production in HEK-293 cells expressing pyruvate carboxylase. *Metab Eng*, 13(5), 499-507. doi:10.1016/j.ymben.2011.05.004
- Hossler, P., Khattak, S. F., & Li, Z. J. (2009). Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology*, 19(9), 936-949. doi:10.1093/glycob/cwp079
- Irani, N., Wirth, M., van den Heuvel, J., & Wagner, R. (1999). Improvement of the primary metabolism of cell cultures by introducing a new cytoplasmic pyruvate carboxylase reaction. *Biotechnology and bioengineering*, 66(4), 238-246.
- Irani, N., Wirth, M., van Den Heuvel, J., & Wagner, R. (1999). Improvement of the primary metabolism of cell cultures by introducing a new cytoplasmic pyruvate carboxylase reaction. *Biotechnol Bioeng*, 66(4), 238-246. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10578094>
- Jardon, M. A., Sattha, B., Braasch, K., Leung, A. O., Cote, H. C., Butler, M., . . . Piret, J. M. (2012). Inhibition of glutamine-dependent autophagy increases t-PA production in CHO cell fed-batch processes. *Biotechnol Bioeng*, 109(5), 1228-1238. doi:10.1002/bit.24393
- Karengera, E., Robotham, A., Kelly, J., Durocher, Y., De Crescenzo, G., & Henry, O. (2017). Altering the central carbon metabolism of HEK293 cells: Impact on recombinant glycoprotein quality. *J Biotechnol*, 242, 73-82. doi:10.1016/j.jbiotec.2016.12.003
- Kim do, Y., Chaudhry, M. A., Kennard, M. L., Jardon, M. A., Braasch, K., Dionne, B., . . . Piret, J. M. (2013). Fed-batch CHO cell t-PA production and feed glutamine replacement to reduce ammonia production. *Biotechnol Prog*, 29(1), 165-175. doi:10.1002/btpr.1658
- Lee, Y. Y., Yap, M. G., Hu, W. S., & Wong, K. T. (2003). Low-Glutamine Fed-Batch Cultures of 293-HEK Serum-Free Suspension Cells for Adenovirus Production. *Biotechnology progress*, 19(2), 501-509.
- Lin, N., Mascarenhas, J., Sealover, N. R., George, H. J., Brooks, J., Kayser, K. J., . . . Archer-Hartmann, S. (2015). Chinese hamster ovary (CHO) host cell engineering to increase sialylation of recombinant therapeutic proteins by modulating sialyltransferase expression. *Biotechnology progress*, 31(2), 334-346.

- Liu, B., Spearman, M., Doering, J., Lattová, E., Perreault, H., & Butler, M. (2014). The availability of glucose to CHO cells affects the intracellular lipid-linked oligosaccharide distribution, site occupancy and the N-glycosylation profile of a monoclonal antibody. *Journal of biotechnology*, 170, 17-27.
- Loignon, M., Perret, S., Kelly, J., Boulais, D., Cass, B., Bisson, L., . . . Durocher, Y. (2008). Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFN $\alpha$ 2b in HEK293 cells. *BMC Biotechnol*, 8, 65. doi:10.1186/1472-6750-8-65
- Lundquist, J. J., & Toone, E. J. (2002). The cluster glycoside effect. *Chemical reviews*, 102(2), 555-578.
- Maranga, L., & Goochee, C. F. (2006). Metabolism of PER. C6TM cells cultivated under fed-batch conditions at low glucose and glutamine levels. *Biotechnology and bioengineering*, 94(1), 139-150.
- McDermott, R., & Butler, M. (1993). Uptake of glutamate, not glutamine synthetase, regulates adaptation of mammalian cells to glutamine-free medium. *Journal of cell science*, 104(1), 51-58.
- Morell, A. G., Gregoriadis, G., Scheinberg, I. H., Hickman, J., & Ashwell, G. (1971). The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. *Journal of Biological Chemistry*, 246(5), 1461-1467.
- Nadeau, I., Sabatie, J., Koehl, M., Perrier, M., & Kamen, A. (2000). Human 293 cell metabolism in low glutamine-supplied culture: interpretation of metabolic changes through metabolic flux analysis. *Metabolic engineering*, 2(4), 277-292.
- Noguchi, A., Mukuria, C. J., Suzuki, E., & Naiki, M. (1995). Immunogenicity of N-glycolylneuraminic acid-containing carbohydrate chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells. *Journal of biochemistry*, 117(1), 59-62.
- Noh, S. M., & Lee, G. M. (2016). Limitations to the development of recombinant human embryonic kidney 293E cells using glutamine synthetase-mediated gene amplification: Methionine sulfoximine resistance. *Journal of biotechnology*, 231, 136-140.
- Nyman, T. A., Kalkkinen, N., Tölö, H., & Helin, J. (1998). Structural characterisation of N-linked and O-linked oligosaccharides derived from interferon- $\alpha$ 2b and interferon- $\alpha$ 14c produced by

- Sendai-virus-induced human peripheral blood leukocytes. *European journal of biochemistry*, 253(2), 485-493.
- Paredes, C., Prats, E., Cairo, J., Azorin, F., Cornudella, L., & Godia, F. (1999). Modification of glucose and glutamine metabolism in hybridoma cells through metabolic engineering. *Cytotechnology*, 30(1-3), 85-93.
- Rajendra, Y., Kiseljak, D., Baldi, L., Hacker, D. L., & Wurm, F. M. (2012). Reduced glutamine concentration improves protein production in growth-arrested CHO-DG44 and HEK-293E cells. *Biotechnology letters*, 34(4), 619-626.
- Ryll, T., Valley, U., & Wagner, R. (1994). Biochemistry of growth inhibition by ammonium ions in mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 44(2), 184-193.
- Sauer, P. W., Burky, J. E., Wesson, M. C., Sternard, H. D., & Qu, L. (2000). A high-yielding, generic fed-batch cell culture process for production of recombinant antibodies. *Biotechnology and bioengineering*, 67(5), 585-597.
- Sellers, K., Fox, M. P., Bousamra, M., Slone, S. P., Higashi, R. M., Miller, D. M., . . . Deshpande, R. (2015). Pyruvate carboxylase is critical for non-small-cell lung cancer proliferation. *The Journal of clinical investigation*, 125(2), 687-698.
- Shanware, N. P., Bray, K., Eng, C. H., Wang, F., Follettie, M., Myers, J., . . . Abraham, R. T. (2014). Glutamine deprivation stimulates mTOR-JNK-dependent chemokine secretion. *Nature communications*, 5.
- Shibuya, N., Goldstein, I., Broekaert, W., Nsimba-Lubaki, M., Peeters, B., & Peumans, W. (1987). The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac (alpha 2-6) Gal/GalNAc sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 262(4), 1596-1601.
- Sinclair, A. M., & Elliott, S. (2005). Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. *Journal of pharmaceutical sciences*, 94(8), 1626-1635.
- Tardito, S., Oudin, A., Ahmed, S. U., Fack, F., Keunen, O., Zheng, L., . . . Wagner, A. (2015). Glutamine synthetase activity fuels nucleotide biosynthesis and supports growth of glutamine-restricted glioblastoma. *Nature cell biology*.

- Taschwer, M., Hackl, M., Bort, J. A. H., Leitner, C., Kumar, N., Puc, U., . . . Altmann, F. (2012). Growth, productivity and protein glycosylation in a CHO EpoFc producer cell line adapted to glutamine-free growth. *Journal of biotechnology*, 157(2), 295-303.
- Toussaint, C., Henry, O., & Durocher, Y. (2016). Metabolic engineering of CHO cells to alter lactate metabolism during fed-batch cultures. *Journal of biotechnology*, 217, 122-131.
- Vallée, C., Durocher, Y., & Henry, O. (2014). Exploiting the metabolism of PYC expressing HEK293 cells in fed-batch cultures. *Journal of biotechnology*, 169, 63-70.
- Valley, U., Nimtz, M., Conradt, H. S., & Wagner, R. (1999). Incorporation of ammonium into intracellular UDP-activated N-acetylhexosamines and into carbohydrate structures in glycoproteins. *Biotechnology and bioengineering*, 64(4), 401-417.
- Wellen, K. E., Lu, C., Mancuso, A., Lemons, J. M., Ryczko, M., Dennis, J. W., . . . Thompson, C. B. (2010). The hexosamine biosynthetic pathway couples growth factor-induced glutamine uptake to glucose metabolism. *Genes & development*, 24(24), 2784-2799.
- Willems, A. P., van Engelen, B. G., & Lefeber, D. J. (2016). Genetic defects in the hexosamine and sialic acid biosynthesis pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1860(8), 1640-1654.
- Wong, D. C., Wong, N. S., Goh, J. S., May, L. M., & Yap, M. G. (2010). Profiling of N-glycosylation gene expression in CHO cell fed-batch cultures. *Biotechnol Bioeng*, 107(3), 516-528. doi:10.1002/bit.22828
- Yang, M., & Butler, M. (2000). Effects of ammonia on CHO cell growth, erythropoietin production, and glycosylation. *Biotechnology and bioengineering*, 68(4), 370-380.
- Yang, M., & Butler, M. (2002). Effects of ammonia and glucosamine on the heterogeneity of erythropoietin glycoforms. *Biotechnology progress*, 18(1), 129-138.
- Yin, B., Gao, Y., Chung, C. y., Yang, S., Blake, E., Stuczynski, M. C., . . . Zhang, H. (2015). Glycoengineering of Chinese hamster ovary cells for enhanced erythropoietin N-glycan branching and sialylation. *Biotechnology and bioengineering*, 112(11), 2343-2351.



- Zagari, F., Jordan, M., Stettler, M., Broly, H., & Wurm, F. M. (2013). Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity. *New biotechnology*, 30(2), 238-245.
- Zhang, F., Sun, X., Yi, X., & Zhang, Y. (2006). Metabolic characteristics of recombinant Chinese hamster ovary cells expressing glutamine synthetase in presence and absence of glutamine. *Cytotechnology*, 51(1), 21-28. doi:10.1007/s10616-006-9010-y
- Zhou, M., Crawford, Y., Ng, D., Tung, J., Pynn, A. F., Meier, A., . . . Shen, A. (2011). Decreasing lactate level and increasing antibody production in Chinese Hamster Ovary cells (CHO) by reducing the expression of lactate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinases. *J Biotechnol*, 153(1-2), 27-34. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.03.003
- Zhu, J. (2012). Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnol Adv*, 30(5), 1158-1170. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.022

## CHAPITRE 7 DISCUSSION GÉNÉRALE

Étant donné l'importance cruciale de la qualité des glycoprotéines recombinantes sur l'efficacité et l'innocuité des biothérapeutiques, il est primordial d'évaluer l'influence des stratégies d'optimisation des rendements des bioprocédés sur la qualité. De plus, les autorités régulatrices exigent un contrôle et une caractérisation fine des attributs de qualité critiques du produit, ce qui implique un besoin urgent de développer des méthodes de suivi de la qualité en cours de culture.

Dans ce cadre et dans le but de développer des stratégies d'amélioration de la production et de la qualité des glycoprotéines thérapeutiques, nous avons d'abord comparé la lignée HEK293 surexprimant la PYC2 et sa lignée parentale, toutes deux produisant une glycoprotéine thérapeutique, l'interféron  $\alpha 2b$ , qui possède un unique site de glycosylation. Ensuite, nous avons combiné la stratégie PYC2 avec des approches de substitution de la glutamine afin de réduire simultanément la production de lactate et d'ammonium et mettre en évidence un éventuel effet synergique sur la production et la qualité de l'interféron  $\alpha 2b$ . Cela a permis la mise en évidence d'une caractéristique supplémentaire des cellules PYC2 : la faculté de croître relativement bien en culture sans glutamine. Cette particularité a été exploitée avec succès dans des cultures en mode *fed-batch* en flacons et en bioréacteurs pour maximiser la production et la qualité de l'IFN $\alpha 2b$ . Parallèlement, nous avons utilisé la résonance plasmonique de surface associée à des lectines spécifiques pour l'évaluation de la qualité. Cet outil a été envisagé pour le développement d'une méthode de suivi de la glycosylation en cours de culture. À cet égard, l'analyse de la glycosylation, directement à partir du surnageant de culture, a été étudiée (voir Annexe A).

### 7.1 L'influence de la modification PYC2 sur la qualité de l'interféron $\alpha 2b$

La diminution de l'accumulation des métabolites toxiques, principalement le lactate et l'ammonium est un enjeu important pour assurer des performances optimales des procédés de culture de cellules de mammifère. La surexpression du gène de la pyruvate carboxylase de levure (PYC2) améliore le métabolisme central du carbone et mène à une réduction drastique de l'accumulation de lactate (Elias et al., 2003; Irani, N., Wirth, M., van Den Heuvel, J., & Wagner, R., 1999; Kim, S. H. & Lee, 2007b). Nonobstant son effet bénéfique sur la production volumétrique

des cultures observé pour différentes lignées cellulaires, l'impact de cette stratégie sur la qualité de la protéine recombinante est très longtemps resté indéterminé.

Les résultats de nos travaux ont démontré qu'en plus d'améliorer notablement le métabolisme central du carbone, la surexpression du gène PYC2 mène à la production d'IFN $\alpha$ 2b de meilleure qualité. En effet, la présence d'IFN $\alpha$ 2b tronqués aux extrémités de la chaîne polypeptidique suggère fortement que plusieurs clivages protéolytiques se produisent en phase tardive des cultures des cellules parentales. En outre, nous avons observé la présence de glycoformes désialylées de la protéine ainsi que, en moindre mesure, d'isoformes non glycosylées. La décroissance graduelle de la qualité observée au cours du temps fut corrélée avec le déclin plus important de la viabilité constaté dans les cultures des cellules parentales. Cela a suggéré une dégradation des conditions environnementales ayant eu un impact néfaste sur la qualité. En effet, comme cela a été observé dans de nombreuses études, la décroissance de la qualité est attribuée à une augmentation importante de protéases et de glucosidases dans le milieu de culture suite au déclin de la viabilité cellulaire (Chuan et al., 2006; Hansen, K. et al., 1997; Tan et al., 2015). La modification PYC2, en améliorant le métabolisme cellulaire, influence favorablement la qualité de la protéine recombinante. En effet, la faible production de lactate observée chez les cellules PYC2 favorise une haute viabilité cellulaire, ce qui retarde la libération des protéases lors de la lyse cellulaire. Le lactate est un inhibiteur bien connu de la croissance et de la productivité cellulaires. Bien qu'aucun effet direct sur la qualité de la protéine recombinante n'ait été mis en évidence à ce jour, son accumulation influence indirectement la qualité en favorisant la mort cellulaire. De plus, comme discuté au point 2.2.4 (page 18), un métabolisme caractérisé par une grande consommation de glucose et de glutamine ainsi qu'une grande accumulation de lactate peut être associé à un flux diminué vers la voie HBP, ce qui pourrait également influencer la qualité des glycoprotéines (Araujo et al., 2017). Cependant, bien que l'effet bénéfique du métabolisme PYC2 sur l'utilisation des nutriments ait été démontré pour différentes lignées de cellules de mammifère, son effet sur la qualité pourrait varier en fonction du type cellulaire. Par exemple, il a récemment été démontré que les lignées HEK293 et CHO présentent des différences au niveau de leur utilisation des principaux nutriments (Noh & Lee, 2016). La surexpression du gène PYC2 pourrait exacerber ces différences et comme le métabolisme du glucose et de la glutamine sont intimement liés au mécanisme de la glycosylation (voir point 2.2.4 page 18), cela pourrait se traduire par des différences sur la qualité des glycoprotéines produites dans ces deux lignées cellulaires. L'analyse des flux des métabolites,

en parallèle avec la mesure des concentrations intracellulaires en nucléotides-oses, permettrait de dresser un tableau beaucoup plus précis de l'influence du métabolisme PYC2 sur le mécanisme de glycosylation.

## **7.2 La combinaison du métabolisme PYC2 avec des stratégies de réduction de l'accumulation de l'ammonium**

Bien que les cultures de cellules PYC2 présentent des concentrations réduites en lactate, l'accumulation de l'ammonium diffère peu de celle observée dans les cultures des cellules parentales. De plus, particulièrement en mode *fed-batch*, la longévité accrue des cultures a pour conséquence une plus grande accumulation de ce sous-produit du métabolisme de la glutamine. Dans la littérature, aucune étude n'a combiné le phénotype avantageux des cellules PYC2 avec des approches de réduction de l'accumulation de l'ammonium. Dans le but de réduire simultanément la production des deux principaux déchets métaboliques (le lactate et l'ammonium) et ainsi favoriser la production et la qualité de la glycoprotéine recombinante, nous avons testé des substitutions de la glutamine.

Le pyruvate s'est avéré être un substitut de choix dans les cultures des cellules PYC2 et des cellules parentales. En remplaçant la glutamine par le pyruvate, les titres en protéines ont été multipliés par au moins 1,5 pour les deux lignées. Cela fut la conséquence d'une réduction significative de l'accumulation d'ammonium qui a résulté en une meilleure croissance et une meilleure viabilité cellulaire. Nous avons constaté qu'alimenter en pyruvate (en combinaison avec le glucose) en cours de culture ou le fournir initialement n'influence pas la production volumétrique en interféron  $\alpha 2b$ . De plus, comme étudié à l'aide de lectines spécifiques, la supplémentation en ManNAc et en cytidine permet de maintenir une haute qualité d'IFN $\alpha 2b$ . L'utilisation du pyruvate s'est également révélée efficace pour remplacer la glutamine dans les lignées cellulaires CHO, BHK et MDCK (Genzel, Ritter, König, Alt, & Reichl, 2005). Comme une amélioration a été observée dans les deux lignées cellulaires HEK293 que nous avons étudiées (la lignée PYC2 et la lignée parentale), nos travaux démontrent que le pyruvate peut également substituer efficacement la glutamine dans cette lignée cellulaire humaine. Dans le cas des cellules PYC2, remplacer la glutamine par le pyruvate a sensiblement réduit la croissance tout en augmentant la production d'IFN $\alpha 2b$ . Cependant, comme les cultures sans glutamine ont également démontré une

productivité volumétrique améliorée, il se pourrait que l'effet sur la production soit plutôt lié à l'absence de glutamine dans le cas de ces cellules. Les cellules HEK293, comme la plupart des lignées cultivées de cellules mammifère, nécessitent un apport en glutamine pour leur croissance. Bien que ces cellules survivent mieux sans glutamine que les cellules CHO (Noh & Lee, 2016), nous avons observé que la lignée HEK293 parentale est incapable de croître convenablement en absence de glutamine. Le métabolisme PYC2 fournit donc un avantage important en absence de glutamine en permettant de soutenir la croissance et la production protéique à partir du glucose comme principale source de carbone. Bien que cela mène à une plus faible densité cellulaire, la diminution de l'accumulation d'ammonium qui en découle favorise une meilleure viabilité cellulaire ainsi qu'une plus grande production volumétrique en IFN $\alpha$ 2b.

La mise en évidence de cette particularité des cellules PYC2 nous a encouragés à l'exploiter en culture *fed-batch*. Malgré une longue phase de latence, les cultures des cellules PYC2 alimentées en glucose à l'aide d'une solution nutritive concentrée sans glutamine, ont démontré une diminution significative de la concentration finale en ammonium ainsi qu'une amélioration importante de la production d'IFN $\alpha$ 2b. En ce qui concerne la qualité de l'IFN $\alpha$ 2b, cette stratégie n'a pas eu d'influence néfaste comme démontré en étudiant l'interaction avec la lectine SNA et également par analyse LC-MS. Le choix de l'utilisation d'une solution nutritive complexe contenant du glucose mais sans glutamine, plutôt qu'une solution ne contenant que du glucose, a été motivé par le besoin de fournir aux cellules un grand ensemble de nutriments pour soutenir la croissance, la production et la qualité de l'IFN $\alpha$ 2b. Bien que cette solution puisse contenir d'autres molécules susceptibles de générer de l'ammonium, nous avons néanmoins constaté une réduction drastique de la concentration finale en ce composé. Dans la plupart des cultures de cellules de mammifère, l'absence de glutamine mène à une inhibition de la croissance. La surexpression du gène de la glutamine synthétase (GS) dans les lignées cellulaires permet de pallier la nécessité d'alimenter en glutamine, réduisant ainsi la génération d'ammonium. Par exemple, dans le but de réduire simultanément la production de lactate et d'ammonium, Soo Min Noh et al. (2017) ont combiné la modification GS avec la répression de l'expression de l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH). Bien que cette stratégie ait permis la diminution de ces deux déchets métaboliques, les cellules réprimant la LDH ont démontré une plus grande dépendance à la glutamine, ce qui a compromis la sélection basée sur le MSX des cellules exprimant également la GS (Noh, Park, Lim, Kim, & Lee, 2016). L'absence de glutamine dans le milieu de culture fait aussi courir un risque

pour la qualité de la protéine recombinante car la glutamine a un rôle important dans la synthèse des précurseurs de la glycosylation. Malgré cela, nous avons observé des profils de glycosylation similaires en fin de culture. Cela pourrait suggérer que les cellules PYC2 auraient généré une quantité minimale de glutamine ou bien utilisé une source alternative pour soutenir la glycosylation. Cette étude a démontré qu'avec une unique modification métabolique, la surexpression de l'enzyme PYC2, il est possible de réduire simultanément le lactate et l'ammonium en culture sans glutamine et ainsi augmenter la production la protéine recombinante tout en maintenant une qualité optimale de celle-ci.

## CHAPITRE 8 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

L'exploitation des cellules de mammifère a permis l'émergence de nouveaux traitements, plus sûrs et mieux adaptés pour de nombreuses pathologies qui affectent l'humain. La demande toujours croissante en biothérapeutiques a motivé l'optimisation des rendements de production qui ont connu une amélioration sans précédent durant les dernières décennies. Néanmoins, du fait de l'influence déterminante que peut avoir la qualité des protéines sur leur action thérapeutique mais aussi sur leur innocuité, les compagnies biopharmaceutiques font aujourd'hui face au défi d'optimiser et de contrôler la qualité tout en continuant à développer des stratégies d'amélioration des rendements en protéines. Dans ce cadre, notre travail a apporté une contribution notable et originale aux efforts pour la production de biothérapeutiques plus efficaces et plus sûrs pour le patient.

Nous avons montré qu'il est possible de favoriser à la fois la production tout en maintenant la qualité de la glycoprotéine en combinant une stratégie de génie génétique avec l'optimisation des nutriments. La surexpression du gène PYC2 dans les cellules HEK293 a amélioré grandement leur métabolisme central, ce qui a mené à une plus faible production de lactate, un inhibiteur important de la croissance cellulaire. Cela a retardé l'avènement de la phase de mort cellulaire, reconnue pour être un facteur important de la dégradation de la qualité des protéines. L'analyse de la qualité de l'IFN $\alpha$ 2b, réalisée au moyen de deux techniques orthogonales d'analyse de la glycosylation, nous a permis d'observer que les conditions résultantes sont plus favorables à la glycosylation de l'IFN $\alpha$ 2b. Ces travaux représentent la première étude mettant en évidence l'effet de l'altération du métabolisme central du carbone sur la qualité de la protéine recombinante et démontrent l'avantage du phénotype PYC2 pour la production de glycoprotéines à but thérapeutique.

Une fois débarrassé de l'influence néfaste que représente le lactate pour la croissance cellulaire et la production grâce au métabolisme PYC2, l'ammonium devient le principal inhibiteur à l'amélioration des performances des cultures. Cela nous a conduit à réaliser la première étude combinant la stratégie PYC2 avec des approches de substitution de la glutamine. Nous avons démontré l'efficacité du pyruvate à améliorer la croissance et la production dans les cultures et réussi à concilier une haute production et une haute qualité de protéine à l'aide de précurseurs de la glycosylation. Ensuite, nous avons aussi mis en évidence une amélioration de la production

d'IFN $\alpha$ 2b qui survient lorsque les cellules PYC2 sont cultivées en conditions sans glutamine. Cette particularité, inédite pour une cellule de mammifère non modifiée pour exprimer la glutamine synthétase, a été exploitée en culture *fed-batch* sans glutamine en bioréacteur menant à une nette amélioration de la production et à une haute qualité d'IFN $\alpha$ 2b.

Avec ce travail, nous avons étudié l'influence de l'altération du métabolisme central du carbone sur la qualité des glycoprotéines. De plus, nous avons mis en lumière une particularité jusque-là insoupçonnée conférée par le métabolisme PYC2 que nous avons exploitée avec succès pour réduire simultanément l'accumulation du lactate et de l'ammonium. Les stratégies développées démontrent que l'amélioration du métabolisme central du carbone par la surexpression du gène PYC2 permet de répondre aux défis que représente l'accumulation des métabolites toxiques. Cela offre une approche simple et originale pour la production de grandes concentrations de glycoprotéines de haute qualité.

Une compréhension plus profonde de l'influence du métabolisme central sur le mécanisme de la glycosylation (et réciproquement) apporterait une contribution significative aux efforts pour l'optimisation de la production et de la qualité des glycoprotéines. En effet, de nombreuses pistes restent encore à explorer. Il serait par exemple intéressant d'analyser les flux intracellulaires du métabolisme central du carbone en parallèle avec les concentrations intracellulaires en précurseurs de la glycosylation tout en évaluant la qualité de la glycoprotéine recombinante produite. Cela apporterait des connaissances supplémentaires dans la compréhension des liens entre le métabolisme central et le mécanisme de glycosylation afin de mieux concevoir les stratégies d'amélioration de la production et de la qualité. En outre, comme le métabolisme cellulaire varie tout au long de la culture, il serait intéressant d'évaluer son influence sur la glycosylation en fonction des différentes phases de croissance cellulaire. Éventuellement, des cultures en mode perfusion permettraient une étude dans des conditions plus contrôlées en termes de dynamique cellulaire.

Par exemple, nous pourrions envisager de réaliser des cultures des cellules PYC2 en mode perfusion avec et sans glutamine. Le milieu nutritif de la culture sans glutamine contiendrait du glucose marqué isotopiquement au carbone 13 ainsi que du glutamate marqué à l'azote 15. La culture contrôle contiendrait les mêmes molécules en plus de la glutamine non marquée. Nous pourrions ensuite analyser les nucléotides oses intracellulaires et les glycans de la protéine



recombinante (après séparation de ceux-ci avec la protéine) pour évaluer la présence de C<sup>13</sup> et de N<sup>15</sup>. En comparant la teneur en carbone 13 des nucléotides oses avec les flux métaboliques liés au métabolisme central, nous pourrions évaluer si dans les deux conditions étudiées, une différence existe dans la proportion du glucose consommé qui est dirigé vers la voie de synthèse des hexosamines (HBP). De plus, nous pourrions déterminer si, en conditions sans glutamine, l'azote présent dans les glycanes provient du glutamate, ce qui impliquerait donc une activité glutamine synthetase. La comparaison entre les concentrations intracellulaires des différents nucléotides oses et le degré de glycosylation de la protéine recombinante permettrait de mettre en évidence les étapes limitantes et ainsi mettre en lumière d'éventuelles nouvelles voies de modulation de la glycosylation. La comparaison des flux métaboliques liés au métabolisme central du carbone nous permettrait également de mieux comprendre le mécanisme donnant lieu au phénotype observé en culture sans glutamine des cellules PYC2. À cette occasion, comme en mode perfusion le taux de croissance cellulaire peut être modulé en variant le taux de dilution, il serait également intéressant d'évaluer l'influence du taux de croissance sur la glycosylation. En effet, très peu d'informations sont disponibles actuellement dans la littérature sur l'influence du taux de croissance cellulaire sur la qualité de la protéine recombinante. Enfin, comme les différents types de cellules de mammifère utilisées pour la production de protéines thérapeutiques peuvent présenter de grandes différences dans leur métabolisme, il serait intéressant d'étudier l'effet des stratégies développées dans cette étude sur les performances d'autres lignées cellulaires comme par exemple les lignées CHO, PER.C6 ou NS0.

## RÉFÉRENCES

- Aghamohseni, H., Ohadi, K., Spearman, M., Krahn, N., Moo-Young, M., Scharer, J. M., . . . Budman, H. M. (2014). Effects of Nutrient Levels and Average Culture pH on the Glycosylation Pattern of Camelid-humanized Monoclonal Antibody. *Journal of Biotechnology*.
- Ahn, W. S., Jeon, J. J., Jeong, Y. R., Lee, S. J., & Yoon, S. K. (2008). Effect of culture temperature on erythropoietin production and glycosylation in a perfusion culture of recombinant CHO cells. *Biotechnology and bioengineering*, 101(6), 1234-1244.
- Albrecht, S., Hilliard, I. M., & Rudd, I. P. Therapeutic proteins: facing the challenges of glycobiology.
- Altamirano, C., Illanes, A., Becerra, S., Cairó, J. J., & Gòdia, F. (2006). Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose. *Journal of Biotechnology*, 125(4), 547-556.
- Altamirano, C., Paredes, C., Cairo, J., & Godia, F. (2000). Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine. *Biotechnology Progress*, 16(1), 69-75.
- Ambrosi, M., Cameron, N. R., & Davis, B. G. (2005). Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Organic & biomolecular chemistry*, 3(9), 1593-1608.
- Andersen, D. C. (1994). *The effects of factors in the cell culture environment on o-linked glycosylation*. (Stanford University).
- Andersen, D. C., & Goochee, C. F. (1995). The effect of ammonia on the O-linked glycosylation of granulocyte colony-stimulating factor produced by chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and bioengineering*, 47(1), 96-105.
- Angata, T., & Varki, A. (2002). Chemical diversity in the sialic acids and related  $\alpha$ -keto acids: an evolutionary perspective. *Chemical reviews*, 102(2), 439-470.
- Araujo, L., Khim, P., Mkhikian, H., Mortales, C.-L., & Demetriou, M. (2017). Glycolysis and glutaminolysis cooperatively control T cell function by limiting metabolite supply to N-glycosylation. *eLife*, 6, e21330.
- Arnold, E., Hammami, I., Chen, J., Gupte, S., Durocher, Y., & Jolicoeur, M. (2016). Overexpression of G6PDH does not affect the behavior of HEK-293 clones stably expressing interferon- $\alpha$ 2b. *AIMS BIOENGINEERING*, 3(3), 319-336.
- Ashwell, G., & Harford, J. (1982). Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annual review of biochemistry*, 51(1), 531-554.
- Baker, K. N., Rendall, M. H., Hills, A. E., Hoare, M., Freedman, R. B., & James, D. C. (2001). Metabolic control of recombinant protein N-glycan processing in NS0 and CHO cells. *Biotechnology and bioengineering*, 73(3), 188-202.

- Barnabé, N., & Butler, M. (1994). Effect of temperature on nucleotide pools and monoclonal antibody production in a mouse hybridoma. *Biotechnology and bioengineering*, 44(10), 1235-1245.
- Barron, N., Kumar, N., Sanchez, N., Doolan, P., Clarke, C., Meleady, P., . . . Clynes, M. (2011). Engineering CHO cell growth and recombinant protein productivity by overexpression of miR-7. *Journal of biotechnology*, 151(2), 204-211.
- Behan, J. L., & Smith, K. D. (2011). The analysis of glycosylation: a continued need for high pH anion exchange chromatography. *Biomedical Chromatography*, 25(1-2), 39-46.
- Birch, J., Boraston, R., Metcalfe, H., Brown, M., Bebbington, C., & Field, R. (1994). Selecting and designing cell lines for improved physiological characteristics. *Cytotechnology*, 15(1-3), 11-16.
- Blondeel, E. J., Braasch, K., McGill, T., Chang, D., Engel, C., Spearman, M., . . . Aucoin, M. G. (2015). Tuning a MAb glycan profile in cell culture: Supplementing N-acetylglucosamine to favour G0 glycans without compromising productivity and cell growth. *Journal of biotechnology*, 214, 105-112.
- Bollati-Fogolin, M., Forno, G., Nimtz, M., Conradt, H. S., Etcheverrigaray, M., & Kratje, R. (2005). Temperature Reduction in Cultures of hGM-CSF-expressing CHO Cells: Effect on Productivity and Product Quality. *Biotechnology progress*, 21(1), 17-21.
- Bork, K., Horstkorte, R., & Weidemann, W. (2009). Increasing the sialylation of therapeutic glycoproteins: the potential of the sialic acid biosynthetic pathway. *Journal of pharmaceutical sciences*, 98(10), 3499-3508.
- Bork, K., Reutter, W., Weidemann, W., & Horstkorte, R. (2007). Enhanced sialylation of EPO by overexpression of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManAc kinase containing a sialuria mutation in CHO cells. *FEBS letters*, 581(22), 4195-4198.
- Bragonzi, A., Distefano, G., Buckberry, L. D., Acerbis, G., Foglieni, C., Lamotte, D., . . . Monaco, L. (2000). A new Chinese hamster ovary cell line expressing  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase used as universal host for the production of human-like sialylated recombinant glycoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1474(3), 273-282. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4165\(00\)00023-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4165(00)00023-4)
- Braun, A., Kwee, L., Labow, M. A., & Alsenz, J. (1997). Protein aggregates seem to play a key role among the parameters influencing the antigenicity of interferon alpha (IFN- $\alpha$ ) in normal and transgenic mice. *Pharmaceutical research*, 14(10), 1472-1478.
- Brillanti, S., Garson, J., Foli, M., Whitby, K., Deaville, R., Masci, C., . . . Barbara, L. (1994). A pilot study of combination therapy with ribavirin plus interferon alfa for interferon alfa-resistant chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, 107(3), 812-817.
- Brooks, S. A. (2004). Appropriate glycosylation of recombinant proteins for human use. *Molecular biotechnology*, 28(3), 241-255.
- Burleigh, S. C., van de Laar, T., Stroop, C. J., van Grunsven, W. M., O'Donoghue, N., Rudd, P. M., & Davey, G. P. (2011). Synergizing metabolic flux analysis and nucleotide sugar metabolism to understand the control of glycosylation of recombinant protein in CHO cells. *BMC biotechnology*, 11(1), 1.

- Butler, M. (2006). Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by Mammalian cell systems. *Cytotechnology*, 50(1-3), 57-76. doi:10.1007/s10616-005-4537-x
- Butler, M., & Spearman, M. (2014). The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering. *Current opinion in biotechnology*, 30, 107-112.
- Campbell, C. T., & Yarema, K. J. (2005). Large-scale approaches for glycobiology. *Genome biology*, 6(11), 236.
- Cha, H.-M., Lim, J.-H., Yeon, J.-H., Hwang, J.-M., & Kim, D.-I. (2017). Co-overexpression of Mgat1 and Mgat4 in CHO cells for production of highly sialylated albumin-erythropoietin. *Enzyme and Microbial Technology*, 103, 53-58.
- Chacko, B. K., & Appukuttan, P. (2001). Peanut (*Arachis hypogaea*) lectin recognizes  $\alpha$ -linked galactose, but not N-acetyl lactosamine in N-linked oligosaccharide terminals. *International journal of biological macromolecules*, 28(5), 365-371.
- Chan, Y. M., Lee, P., Jungles, S., Morris, G., Cadaoas, J., Skrinar, A., . . . Kakkis, E. (2017). Substantial deficiency of free sialic acid in muscles of patients with GNE myopathy and in a mouse model. *PloS one*, 12(3), e0173261.
- Chavane, N., Jacquemart, R., Hoemann, C. D., Jolicoeur, M., & De Crescenzo, G. (2008). At-line quantification of bioactive antibody in bioreactor by surface plasmon resonance using epitope detection. *Analytical biochemistry*, 378(2), 158-165.
- Chee Fung Wong, D., Tin Kam Wong, K., Tang Goh, L., Kiat Heng, C., & Gek Sim Yap, M. (2005). Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation quality in CHO cell cultures. *Biotechnol Bioeng*, 89(2), 164-177. doi:10.1002/bit.20317
- Chen, K., Liu, Q., Xie, L., Sharp, P. A., & Wang, D. I. (2001). Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production. *Biotechnology and bioengineering*, 72(1), 55-61.
- Chen, S., LaRoche, T., Hamelinck, D., Bergsma, D., Brenner, D., Simeone, D., . . . Haab, B. B. (2007). Multiplexed analysis of glycan variation on native proteins captured by antibody microarrays. *Nature methods*, 4(5), 437-444.
- Chen, X., & Varki, A. (2010). Advances in the biology and chemistry of sialic acids. *ACS chemical biology*, 5(2), 163-176.
- Chong, W. P., Reddy, S. G., Yusufi, F. N., Lee, D.-Y., Wong, N. S., Heng, C. K., . . . Ho, Y. S. (2010). Metabolomics-driven approach for the improvement of Chinese hamster ovary cell growth: overexpression of malate dehydrogenase II. *Journal of biotechnology*, 147(2), 116-121.
- Chuan, K. H., Lim, S. F., Martin, L., Yun, C. Y., Loh, S. O., Lasne, F., & Song, Z. (2006). Caspase activation, sialidase release and changes in sialylation pattern of recombinant human erythropoietin produced by CHO cells in batch and fed-batch cultures. *Cytotechnology*, 51(2), 67-79. doi:10.1007/s10616-006-9016-5

- Chuppa, S., Tsai, Y. S., Yoon, S., Shackleford, S., Rozales, C., Bhat, R., . . . Naveh, D. (1997). Fermentor temperature as a tool for control of high-density perfusion cultures of mammalian cells. *Biotechnology and bioengineering*, 55(2), 328-338.
- Clark, S., Muslin, E., & Henson, C. (2004). Effect of adding and removing N-glycosylation recognition sites on the thermostability of barley  $\alpha$ -glucosidase. *Protein Engineering Design and Selection*, 17(3), 245-249.
- Croset, A., Delafosse, L., Gaudry, J. P., Arod, C., Glez, L., Losberger, C., . . . Antonsson, B. (2012). Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells. *J Biotechnol*, 161(3), 336-348. doi:10.1016/j.jbiotec.2012.06.038
- Crowell, C. K., Grampp, G. E., Rogers, G. N., Miller, J., & Scheinman, R. I. (2007). Amino acid and manganese supplementation modulates the glycosylation state of erythropoietin in a CHO culture system. *Biotechnology and bioengineering*, 96(3), 538-549.
- Cruz, H., Freitas, C., Alves, P., Moreira, J., & Carrondo, M. (2000). Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. *Enzyme and microbial technology*, 27(1), 43-52.
- Cruz, H. J., Freitas, C. M., Alves, P. M., Moreira, J. L., & Carrondo, M. J. T. (2000). Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(1-2), 43-52. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00151-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00151-4)
- Dakshinamurthy, P., Mukunda, P., Kodaganti, B. P., Shenoy, B. R., Natarajan, B., Maliwalave, A., . . . Maity, S. (2017). Charge variant analysis of proposed biosimilar to Trastuzumab. *Biologicals*.
- De Bank, P., Kellam, B., Kendall, D., & Shakesheff, K. (2003). Surface engineering of living myoblasts via selective periodate oxidation. *Biotechnology and bioengineering*, 81(7), 800-808.
- De Crescenzo, G., Boucher, C., Durocher, Y., & Jolicoeur, M. (2008). Kinetic characterization by surface plasmon resonance-based biosensors: principle and emerging trends. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 1(4), 204-215.
- De Jesus, M., & Wurm, F. M. (2011). Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors. *Eur J Pharm Biopharm*, 78(2), 184-188. doi:10.1016/j.ejpb.2011.01.005
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances*, 27(3), 297-306.
- Ding, N., Nie, H., Sun, X., Sun, W., Qu, Y., Liu, X., . . . Li, Y. (2011). Human serum N-glycan profiles are age and sex dependent. *Age and ageing*, 40(5), 568-575.
- Dorion-Thibaudeau, J., Raymond, C., Lattova, E., Perreault, H., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2014). Towards the development of a surface plasmon resonance assay to evaluate the glycosylation pattern of monoclonal antibodies using the extracellular domains of CD16a and CD64. *J Immunol Methods*. doi:10.1016/j.jim.2014.04.010

- Dotz, V., Haselberg, R., Shubhakar, A., Kozak, R. P., Falck, D., Rombouts, Y., . . . Wuhrer, M. (2015). Mass spectrometry for glycosylation analysis of biopharmaceuticals. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 73, 1-9.
- Dumont, J., Euwart, D., Mei, B., Estes, S., & Kshirsagar, R. (2016). Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Critical reviews in biotechnology*, 36(6), 1110-1122.
- Durocher, Y., & Butler, M. (2009). Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(6), 700-707.
- Elgavish, S., & Shaanan, B. (1997). Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. *Trends in biochemical sciences*, 22(12), 462-467.
- Elias, C. B., Carpentier, E., Durocher, Y., Bisson, L., Wagner, R., & Kamen, A. (2003). Improving glucose and glutamine metabolism of human HEK 293 and trichoplusiani insect cells engineered to express a cytosolic pyruvate carboxylase enzyme. *Biotechnology progress*, 19(1), 90-97.
- EMA. (1999). *Specifications test procedures and acceptance criteria for biotechnilogy/biological products*.
- Englebienne, P., Hoonacker, A. V., & Verhas, M. (2003). Surface plasmon resonance: principles, methods and applications in biomedical sciences. *Journal of Spectroscopy*, 17(2-3), 255-273.
- Erbayraktar, S., Grasso, G., Sfacteria, A., Xie, Q.-w., Coleman, T., Kreilgaard, M., . . . Gokmen, N. (2003). Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(11), 6741-6746.
- EvaluatePharma. (2014). World Preview 2014, Outlook To 2020.
- Fan, Y., Jimenez Del Val, I., Müller, C., Wagtberg Sen, J., Rasmussen, S. K., Kontoravdi, C., . . . Andersen, M. R. (2015). Amino acid and glucose metabolism in fed-batch CHO cell culture affects antibody production and glycosylation. *Biotechnology and bioengineering*, 112(3), 521-535.
- FDA. (1996). *Demonstration of Comparability of Human Biological Products, Including Therapeutic Biotechnology-derived Products*.
- Fliedl, L., Grillari, J., & Grillari-Voglauer, R. (2015). Human cell lines for the production of recombinant proteins: on the horizon. *New biotechnology*, 32(6), 673-679.
- Fogolin, M. B., Wagner, R., Etcheverrigaray, M., & Kratje, R. (2004). Impact of temperature reduction and expression of yeast pyruvate carboxylase on hGM-CSF-producing CHO cells. *J Biotechnol*, 109(1-2), 179-191. doi:10.1016/j.jbiotec.2003.10.035
- Fogolin, M. M. B., Schulz, C., Wagner, R., Etcheverrigaray, M., & Kratje, R. (2001). Expression of Yeast Pyruvate Carboxylate in hGM-CSF-Producing CHO Cells. Dans *Animal Cell Technology: From Target to Market* (p. 241-243): Springer.
- Food, & Administration, D. (2004). Guidance for industry: PAT—A framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing, and quality assurance. *DHHS, Rockville, MD*.

- Fox, S. R., Patel, U. A., Yap, M. G., & Wang, D. I. (2004). Maximizing interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells through temperature shift optimization: experimental and modeling. *Biotechnol Bioeng*, 85(2), 177-184. doi:10.1002/bit.10861
- Gambhir, A., Europa, A. F., & Hu, W.-S. (1999). Alteration of cellular metabolism by consecutive fed-batch cultures of mammalian cells. *Journal of bioscience and bioengineering*, 87(6), 805-810.
- Gawlitsek, M., Ryll, T., Lofgren, J., & Sliwowski, M. B. (2000). Ammonium alters N-glycan structures of recombinant TNFR-IgG: Degradative versus biosynthetic mechanisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(6), 637-646.
- Gawlitsek, M., Valley, U., & Wagner, R. (1998). Ammonium ion and glucosamine dependent increases of oligosaccharide complexity in recombinant glycoproteins secreted from cultivated BHK-21 cells. *Biotechnology and bioengineering*, 57(5), 518-528.
- Genzel, Y., Ritter, J. B., König, S., Alt, R., & Reichl, U. (2005). Substitution of glutamine by pyruvate to reduce ammonia formation and growth inhibition of mammalian cells. *Biotechnology progress*, 21(1), 58-69.
- Geyer, H., & Geyer, R. (2006). Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1764(12), 1853-1869.
- Ghaderi, D., Taylor, R. E., Padler-Karavani, V., Diaz, S., & Varki, A. (2010). Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins. *Nature biotechnology*, 28(8), 863-867.
- Goergen, J.-L., Guedon, E., & Clincke, M.-F. (2011). Procédés de production de protéines recombinantes thérapeutiques: vers une maîtrise de la glycosylation. *Techniques de l'ingénieur*.
- Gornik, O., & Lauc, G. (2008). Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Disease markers*, 25(4-5), 267-278.
- Gramer, M. J., & Goochee, C. F. (1993). Glycosidase activities in Chinese hamster ovary cell lysate and cell culture supernatant. *Biotechnology progress*, 9(4), 366-373.
- Grinnell, B., Walls, J. D., & Gerlitz, B. (1991). Glycosylation of human protein C affects its secretion, processing, functional activities, and activation by thrombin. *Journal of Biological Chemistry*, 266(15), 9778-9785.
- Gu, X., Harmon, B. J., & Wang, D. I. (1997). Site-and branch-specific sialylation of recombinant human interferon-g in Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnology and bioengineering*, 55(2), 390-398.
- Gu, X., & Wang, D. I. C. (1998). Improvement of interferon- $\gamma$  sialylation in Chinese hamster ovary cell culture by feeding of N-acetylmannosamine. *Biotechnology and Bioengineering*, 58(6), 642-648. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19980620)58:6<642::AID-BIT10>3.0.CO;2-9
- Ha, T. K., & Lee, G. M. (2014). Effect of glutamine substitution by TCA cycle intermediates on the production and sialylation of Fc-fusion protein in Chinese hamster ovary cell culture. *J Biotechnol*, 180, 23-29. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.04.002

- Hansen, J. E., Lund, O., Engelbrecht, J., Bohr, H., & Nielsen, J. O. (1995). Prediction of O-glycosylation of mammalian proteins: specificity patterns of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. *Biochem. J*, 308, 801-813.
- Hansen, K., Kjalke, M., Rasmussen, P. B., Kongerslev, L., & Ezban, M. (1997). Proteolytic cleavage of recombinant two-chain factor VIII during cell culture production is mediated by protease (s) from lysed cells. The use of pulse labelling directly in production medium. *Cytotechnology*, 24(3), 227-234.
- Haseley, S. R., Talaga, P., Kamerling, J. P., & Vliegenthart, J. F. (1999). Characterization of the carbohydrate binding specificity and kinetic parameters of lectins by using surface plasmon resonance. *Analytical biochemistry*, 274(2), 203-210.
- Hayter, P. M., Curling, E., Baines, A. J., Jenkins, N., Salmon, I., Strange, P. G., . . . Bull, A. T. (1992). Glucose-limited chemostat culture of chinese hamster ovary cells producing recombinant human interferon- $\gamma$ . *Biotechnology and bioengineering*, 39(3), 327-335.
- Henry, O., & Durocher, Y. (2011). Enhanced glycoprotein production in HEK-293 cells expressing pyruvate carboxylase. *Metab Eng*, 13(5), 499-507. doi:10.1016/j.ymben.2011.05.004
- Higgins, E. (2010). Carbohydrate analysis throughout the development of a protein therapeutic. *Glycoconjugate journal*, 27(2), 211-225.
- Hinderlich, S., Weidemann, W., Yardeni, T., Horstkorte, R., & Huizing, M. (2013). UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase (GNE): a master regulator of sialic acid synthesis. Dans *SialoGlyco Chemistry and Biology I* (p. 97-137): Springer.
- Hirabayashi, J. (2014). *Lectins*: Springer.
- Hong, J. K., Cho, S. M., & Yoon, S. K. (2010). Substitution of glutamine by glutamate enhances production and galactosylation of recombinant IgG in Chinese hamster ovary cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 88(4), 869-876.
- Hossler, P., Khattak, S. F., & Li, Z. J. (2009). Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology*, 19(9), 936-949.
- Hossler, P., Racicot, C., Chumsae, C., McDermott, S., & Cochran, K. (2016). Cell Culture Media Supplementation of Infrequently Used Sugars for the Targeted Shifting of Protein Glycosylation Profiles. *Biotechnology Progress*.
- Hossler, P., Racicot, C., & McDermott, S. (2014). Targeted Shifting of Protein Glycosylation Profiles in Mammalian Cell Culture through Media Supplementation of Cobalt. *J. Glycobiol*, 3, 1.
- Hu, S., & Wong, D. T. (2009). Lectin microarray. *PROTEOMICS-Clinical Applications*, 3(2), 148-154.
- Iglesias, J. L., Lis, H., & Sharon, N. (1982). Purification and Properties of ad-Galactose/N-Acetyl-d-galactosamine-Specific Lectin from *Erythrina cristagalli*. *European Journal of Biochemistry*, 123(2), 247-252.
- Iino, M., Foster, D. C., & Kisiel, W. (1998). Functional consequences of mutations in Ser-52 and Ser-60 in human blood coagulation factor VII. *Archives of biochemistry and biophysics*, 352(2), 182-192.



- Irani, N., Wirth, M., van Den Heuvel, J., & Wagner, R. (1999). Improvement of the primary metabolism of cell cultures by introducing a new cytoplasmic pyruvate carboxylase reaction. *Biotechnol Bioeng*, 66(4), 238-246. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10578094>
- Irani, N., Wirth, M., van den Heuvel, J., & Wagner, R. (1999). Improvement of the primary metabolism of cell cultures by introducing a new cytoplasmic pyruvate carboxylase reaction. *Biotechnology and bioengineering*, 66(4), 238-246.
- Jin, C., Altmann, F., Strasser, R., Mach, L., Schähs, M., Kunert, R., . . . Steinkellner, H. (2008). A plant-derived human monoclonal antibody induces an anti-carbohydrate immune response in rabbits. *Glycobiology*, 18(3), 235-241.
- Johnsson, B., Löfås, S., & Lindquist, G. (1991). Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Analytical biochemistry*, 198(2), 268-277.
- Katrlík, J., Škrabana, R., Mislovičová, D., & Gemeiner, P. (2011). Binding of D-mannose-containing glycoproteins to D-mannose-specific lectins studied by surface plasmon resonance. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 382(1), 198-202.
- Kaufmann, H., Mazur, X., Marone, R., Bailey, J. E., & Fussenegger, M. (2001). Comparative analysis of two controlled proliferation strategies regarding product quality, influence on tetracycline-regulated gene expression, and productivity. *Biotechnology and bioengineering*, 72(6), 592-602.
- Kazuno, S., Fujimura, T., Arai, T., Ueno, T., Nagao, K., Fujime, M., & Murayama, K. (2011). Multi-sequential surface plasmon resonance analysis of haptoglobin-lectin complex in sera of patients with malignant and benign prostate diseases. *Analytical biochemistry*, 419(2), 241-249.
- Kim, H. J., Lee, S. J., & Kim, H.-J. (2008). Antibody-based enzyme-linked lectin assay (ABELLA) for the sialylated recombinant human erythropoietin present in culture supernatant. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 48(3), 716-721.
- Kim, S. H., & Lee, G. M. (2007a). Down-regulation of lactate dehydrogenase-A by siRNAs for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin. *Applied microbiology and biotechnology*, 74(1), 152-159.
- Kim, S. H., & Lee, G. M. (2007b). Functional expression of human pyruvate carboxylase for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells (DG44). *Applied microbiology and biotechnology*, 76(3), 659-665.
- Kochanowski, N. (2005). *Influence des précurseurs de la glycosylation sur la macrohétérogénéité de l'IFN-γ produit en bioréacteur par des cellules CHO*. (Institut National Polytechnique de Lorraine).
- Kontou, M., Weidemann, W., Bauer, C., Reutter, W., & Horstkorte, R. (2008). The key enzyme of sialic acid biosynthesis (GNE) promotes neurite outgrowth of PC12 cells. *Neuroreport*, 19(12), 1239-1242.

- Kornfeld, K., Reitman, M. L., & Kornfeld, R. (1981). The carbohydrate-binding specificity of pea and lentil lectins. Fucose is an important determinant. *Journal of Biological Chemistry*, 256(13), 6633-6640.
- Kozak, R. P., Urbanowicz, P. A., Punyadeera, C., Reiding, K. R., Jansen, B. C., Royle, L., . . . Wuhler, M. (2016). Variation of human salivary O-glycome. *PloS one*, 11(9), e0162824.
- Kunkel, J. P., Jan, D. C., Jamieson, J. C., & Butler, M. (1998). Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody. *Journal of biotechnology*, 62(1), 55-71.
- Kurachi, S., Song, Z., Takagaki, M., Yang, Q., Winter, H. C., Kurachi, K., & Goldstein, I. J. (1998). Sialic-acid-binding lectin from the slug *Limax flavus*. *European journal of biochemistry*, 254(2), 217-222.
- Kwon, K.-S., & Yu, M.-H. (1997). Effect of glycosylation on the stability of  $\alpha$  1-antitrypsin toward urea denaturation and thermal deactivation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1335(3), 265-272.
- Lao, M. S., & Toth, D. (1997). Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnology progress*, 13(5), 688-691.
- Lawson, E. Q., Hedlund, B., Ericson, M. E., Mood, D. A., Litman, G. W., & Middaugh, R. (1983). Effect of carbohydrate on protein solubility. *Archives of biochemistry and biophysics*, 220(2), 572-575.
- Leblanc, Y., Ramon, C., Bihoreau, N., & Chevreux, G. (2017). Charge variants characterization of a monoclonal antibody by ion exchange chromatography coupled on-line to native mass spectrometry: Case study after a long-term storage at + 5° C. *Journal of Chromatography B*, 1048, 130-139.
- Lee, J. H., Kim, Y. G., & Lee, G. M. (2015). Effect of Bcl-xL overexpression on sialylation of Fc-fusion protein in recombinant Chinese hamster ovary cell cultures. *Biotechnology progress*, 31(4), 1133-1136.
- Li, J., Wong, C. L., Vijayasankaran, N., Hudson, T., & Amanullah, A. (2012). Feeding lactate for CHO cell culture processes: Impact on culture metabolism and performance. *Biotechnology and bioengineering*, 109(5), 1173-1186.
- Li, Y., & Chen, X. (2012). Sialic acid metabolism and sialyltransferases: natural functions and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(4), 887-905. doi:10.1007/s00253-012-4040-1
- Liljeblad, M., Lundblad, A., & Pålsson, P. (2002). Analysis of glycoproteins in cell culture supernatants using a lectin immunosensor technique. *Biosensors and Bioelectronics*, 17(10), 883-891.
- Lin, C.-W., Tsai, M.-H., Li, S.-T., Tsai, T.-I., Chu, K.-C., Liu, Y.-C., . . . Shivatare, S. S. (2015). A common glycan structure on immunoglobulin G for enhancement of effector functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(34), 10611-10616.
- Liu, B., Spearman, M., Doering, J., Lattová, E., Perreault, H., & Butler, M. (2014). The availability of glucose to CHO cells affects the intracellular lipid-linked oligosaccharide distribution,

- site occupancy and the N-glycosylation profile of a monoclonal antibody. *Journal of biotechnology*, 170, 17-27.
- Liu, B., Villacres-Barragan, C., Lattova, E., Spearman, M., & Butler, M. (2013). *Differential affects of low glucose on the macroheterogeneity and microheterogeneity of glycosylation in CHO-EG2 camelid monoclonal antibodies*. Communication présentée à BMC Proceedings (vol. 7, p. 1).
- Liu, J., Wang, J., Fan, L., Chen, X., Hu, D., Deng, X., . . . Tan, W.-S. (2015). Galactose supplementation enhance sialylation of recombinant Fc-fusion protein in CHO cell: an insight into the role of galactosylation in sialylation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(7), 1147-1156.
- Loignon, M., Perret, S., Kelly, J., Boulais, D., Cass, B., Bisson, L., . . . Durocher, Y. (2008). Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFN $\alpha$ 2b in HEK293 cells. *BMC Biotechnol*, 8, 65. doi:10.1186/1472-6750-8-65
- Lundquist, J. J., & Toone, E. J. (2002). The cluster glycoside effect. *Chemical reviews*, 102(2), 555-578.
- Maranga, L., & Goochee, C. F. (2006). Metabolism of PER. C6TM cells cultivated under fed-batch conditions at low glucose and glutamine levels. *Biotechnology and bioengineering*, 94(1), 139-150.
- Marino, K., Bones, J., Kattla, J. J., & Rudd, P. M. (2010). A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. *Nat Chem Biol*, 6(10), 713-723. doi:10.1038/nchembio.437
- Maupin, K. A., Liden, D., & Haab, B. B. (2012). The fine specificity of mannose-binding and galactose-binding lectins revealed using outlier motif analysis of glycan array data. *Glycobiology*, 22(1), 160-169.
- McHutchison, J. G., Gordon, S. C., Schiff, E. R., Shiffman, M. L., Lee, W. M., Rustgi, V. K., . . . Albrecht, J. K. (1998). Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *New England Journal of Medicine*, 339(21), 1485-1492.
- Mercille, S., & Massie, B. (1994). Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 44(9), 1140-1154.
- Minch, S. L., Kallio, P. T., & Bailey, J. E. (1995). Tissue Plasminogen Activator Coexpressed in Chinese Hamster Ovary Cells with  $\alpha$  (2, 6)-Sialyltransferase Contains NeuAc $\alpha$  (2, 6) Gal $\beta$  (1, 4) Gl-N-AcR Linkages. *Biotechnology progress*, 11(3), 348-351.
- Miura, Y., Hashii, N., Tsumoto, H., Takakura, D., Ohta, Y., Abe, Y., . . . Endo, T. (2015). Change in N-glycosylation of plasma proteins in Japanese semisupercentenarians. *PloS one*, 10(11), e0142645.
- Morell, A. G., Gregoriadis, G., Scheinberg, I. H., Hickman, J., & Ashwell, G. (1971). The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. *Journal of Biological Chemistry*, 246(5), 1461-1467.
- Morelle, W., Canis, K., Chirat, F., Faid, V., & Michalski, J. C. (2006). The use of mass spectrometry for the proteomic analysis of glycosylation. *Proteomics*, 6(14), 3993-4015.

- Nadeau, I., Garnier, A., Cote, J., Massie, B., Chavarie, C., & Kamen, A. (1996). Improvement of recombinant protein production with the human adenovirus/293S expression system using fed-batch strategies. *Biotechnology and bioengineering*, 51(6), 613-623.
- Nakamura-Tsuruta, S., Kominami, J., Kuno, A., & Hirabayashi, J. (2006). Evidence that *Agaricus bisporus* agglutinin (ABA) has dual sugar-binding specificity. *Biochemical and biophysical research communications*, 347(1), 215-220.
- Narhi, L. O., Arakawa, T., Aoki, K. H., Elmore, R., Rohde, M. F., Boone, T., & Strickland, T. (1991). The effect of carbohydrate on the structure and stability of erythropoietin. *Journal of Biological Chemistry*, 266(34), 23022-23026.
- Neermann, J., & Wagner, R. (1996). Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. *Journal of cellular physiology*, 166(1), 152-169.
- Ni, H., Blajchman, M. A., Ananthanarayanan, V. S., Smith, I. J., & Sheffield, W. P. (2000). Mutation of any site of N-linked glycosylation accelerates the in vivo clearance of recombinant rabbit antithrombin. *Thrombosis research*, 99(4), 407-415.
- Noguchi, A., Mukuria, C. J., Suzuki, E., & Naiki, M. (1995). Immunogenicity of N-glycolylneuraminic acid-containing carbohydrate chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells. *Journal of biochemistry*, 117(1), 59-62.
- Noh, S. M., & Lee, G. M. (2016). Limitations to the development of recombinant human embryonic kidney 293E cells using glutamine synthetase-mediated gene amplification: Methionine sulfoximine resistance. *Journal of biotechnology*, 231, 136-140.
- Noh, S. M., Park, J. H., Lim, M. S., Kim, J. W., & Lee, G. M. (2016). Reduction of ammonia and lactate through the coupling of glutamine synthetase selection and downregulation of lactate dehydrogenase-A in CHO cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-11.
- Nyman, T. A., Kalkkinen, N., Tölö, H., & Helin, J. (1998). Structural characterisation of N-linked and O-linked oligosaccharides derived from interferon- $\alpha$ 2b and interferon- $\alpha$ 14c produced by Sendai-virus-induced human peripheral blood leukocytes. *European journal of biochemistry*, 253(2), 485-493.
- Okazaki, I., Hasegawa, Y., Shinohara, Y., Kamasaki, T., & Bhikhabhai, R. (1995). Determination of the interactions between lectins and glycoproteins by surface plasmon resonance. *Journal of Molecular Recognition*, 8(1-2), 95-99.
- Olsnes, S., Saltvedt, E., & Pihl, A. (1974). Isolation and comparison of galactose-binding lectins from *Abrus precatorius* and *Ricinus communis*. *Journal of Biological Chemistry*, 249(3), 803-810.
- Omasa, T., Higashiyama, K. I., Shioya, S., & Suga, K. i. (1992). Effects of lactate concentration on hybridoma culture in lactate-controlled fed-batch operation. *Biotechnology and bioengineering*, 39(5), 556-564.
- Onitsuka, M., Kim, W.-D., Ozaki, H., Kawaguchi, A., Honda, K., Kajiura, H., . . . Ohtake, H. (2012). Enhancement of sialylation on humanized IgG-like bispecific antibody by

- overexpression of  $\alpha 2$ , 6-sialyltransferase derived from Chinese hamster ovary cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 94(1), 69-80.
- Onitsuka, M., Kim, W.-D., Ozaki, H., Kawaguchi, A., Honda, K., Kajiura, H., . . . Omasa, T. (2012). Enhancement of sialylation on humanized IgG-like bispecific antibody by overexpression of  $\alpha 2$ , 6-sialyltransferase derived from Chinese hamster ovary cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(1), 69-80. doi:10.1007/s00253-011-3814-1
- Ono, M. (1993). Physicochemical and biochemical characteristics of glycosylated recombinant human granulocyte colony stimulating factor (lenograstim). *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, 30, S7-11.
- Otto, R., Santagostino, A., & Schrader, U. (2014). Rapid growth in biopharma: Challenges and opportunities. *McKinsey Insights*.
- Padler-Karavani, V., Yu, H., Cao, H., Chokhawala, H., Karp, F., Varki, N., . . . Varki, A. (2008). Diversity in specificity, abundance, and composition of anti-Neu5Gc antibodies in normal humans: potential implications for disease. *Glycobiology*, 18(10), 818-830.
- Pilobello, K. T., Krishnamoorthy, L., Slawek, D., & Mahal, L. K. (2005). Development of a lectin microarray for the rapid analysis of protein glycopatterns. *Chembiochem*, 6(6), 985-989.
- Radhakrishnan, R., Walter, L. J., Hruza, A., Reichert, P., Trotta, P. P., Nagabhushan, T. L., & Walter, M. R. (1996). Zinc mediated dimer of human interferon- $\alpha$  2b revealed by X-ray crystallography. *Structure*, 4(12), 1453-1463.
- Raju, T. S., & Scallon, B. (2007). Fc Glycans Terminated with N-Acetylglucosamine Residues Increase Antibody Resistance to Papain. *Biotechnology progress*, 23(4), 964-971.
- Raman, R., Raguram, S., Venkataraman, G., Paulson, J. C., & Sasisekharan, R. (2005). Glycomics: an integrated systems approach to structure-function relationships of glycans. *Nature Methods*, 2(11), 817-824.
- Raymond, C., Robotham, A., Spearman, M., Butler, M., Kelly, J., & Durocher, Y. (2015). *Production of  $\alpha 2$ , 6-sialylated IgG1 in CHO cells*. Communication présentée à MAbs (vol. 7, p. 571-583).
- Rosenfeld, R., Bangio, H., Gerwig, G. J., Rosenberg, R., Aloni, R., Cohen, Y., . . . Maya, R. B.-Y. (2007). A lectin array-based methodology for the analysis of protein glycosylation. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 70(3), 415-426.
- Runkel, L., Meier, W., Pepinsky, R. B., Karpusas, M., Whitty, A., Kimball, K., . . . Goelz, S. E. (1998). Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ). *Pharmaceutical research*, 15(4), 641-649.
- Ryll, T., Valley, U., & Wagner, R. (1994). Biochemistry of growth inhibition by ammonium ions in mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 44(2), 184-193.
- Safina, G., Duran, I. B., Alasel, M., & Danielsson, B. (2011). Surface plasmon resonance for real-time study of lectin-carbohydrate interactions for the differentiation and identification of glycoproteins. *Talanta*, 84(5), 1284-1290.
- Sareneva, T., Pirhonen, J., Cantell, K., & Julkunen, I. (1995). N-glycosylation of human interferon- $\gamma$ : glycans at Asn-25 are critical for protease resistance. *Biochemical Journal*, 308(1), 9-14.

- Sato, T. (2014). Lectin-probed western blot analysis. *Lectins: Methods and Protocols*, 93-100.
- Schauer, R. (2000). Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconjugate journal*, 17(7-9), 485-499.
- Schiestl, M., Stangler, T., Torella, C., Čepeljnik, T., Toll, H., & Grau, R. (2011). Acceptable changes in quality attributes of glycosylated biopharmaceuticals. *Nature biotechnology*, 29(4), 310-312.
- Seo, J. S., Min, B. S., Kim, Y. J., Cho, J. M., Baek, E., Cho, M. S., & Lee, G. M. (2014). Effect of glucose feeding on the glycosylation quality of antibody produced by a human cell line, F2N78, in fed-batch culture. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(8), 3509-3515.
- Seth, G., Hossler, P., Yee, J. C., & Hu, W.-S. (2006). Engineering Cells for Cell Culture Bioprocessing – Physiological Fundamentals. 101, 119-164. doi:10.1007/10\_017
- Shankaran, D. R., Gobi, K. V., & Miura, N. (2007). Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 121(1), 158-177.
- Shibuya, N., Goldstein, I., Broekaert, W., Nsimba-Lubaki, M., Peeters, B., & Peumans, W. (1987). The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac ( $\alpha$  2-6) Gal/GalNAc sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 262(4), 1596-1601.
- Shinohara, Y., & Furukawa, J.-i. (2014). Surface Plasmon Resonance as a Tool to Characterize Lectin–Carbohydrate Interactions. *Lectins: Methods and Protocols*, 185-205.
- Shinohara, Y., Hasegawa, Y., Kaku, H., & Shibuya, N. (1997). Elucidation of the mechanism enhancing the avidity of lectin with oligosaccharides on the solid phase surface. *Glycobiology*, 7(8), 1201-1208.
- Sinclair, A. M., & Elliott, S. (2005). Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. *Journal of pharmaceutical sciences*, 94(8), 1626-1635.
- Solá, R. J., & Griebenow, K. (2009). Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. *Journal of pharmaceutical sciences*, 98(4), 1223-1245.
- Solá, R. J., & Griebenow, K. (2010). Glycosylation of therapeutic proteins. *BioDrugs*, 24(1), 9-21.
- Son, Y.-D., Jeong, Y. T., Park, S.-Y., & Kim, J. H. (2011). Enhanced sialylation of recombinant human erythropoietin in Chinese hamster ovary cells by combinatorial engineering of selected genes. *Glycobiology*, 21(8), 1019-1028.
- Sudakevitz, D., Imberty, A., & Gilboa-Garber, N. (2002). Production, properties and specificity of a new bacterial L-fucose-and D-arabinose-binding lectin of the plant aggressive pathogen *Ralstonia solanacearum*, and its comparison to related plant and microbial lectins. *Journal of biochemistry*, 132(2), 353-358.
- Swiech, K., Picanco-Castro, V., & Covas, D. T. (2012). Human cells: new platform for recombinant therapeutic protein production. *Protein Expr Purif*, 84(1), 147-153. doi:10.1016/j.pep.2012.04.023
- Tachibana, K., Nakamura, S., Wang, H., Iwasaki, H., Tachibana, K., Maebara, K., . . . Narimatsu, H. (2006). Elucidation of binding specificity of Jacalin toward O-glycosylated peptides: quantitative analysis by frontal affinity chromatography. *Glycobiology*, 16(1), 46-53.

- Tailford, L. E., Crost, E. H., Kavanaugh, D., & Juge, N. (2015). Mucin glycan foraging in the human gut microbiome. *Frontiers in genetics*, 6.
- Tan, J. G., Lee, Y. Y., Wang, T., Yap, M. G., Tan, T. W., & Ng, S. K. (2015). Heat shock protein 27 overexpression in CHO cells modulates apoptosis pathways and delays activation of caspases to improve recombinant monoclonal antibody titre in fed-batch bioreactors. *Biotechnology journal*, 10(5), 790-800.
- Tangvoranuntakul, P., Gagneux, P., Diaz, S., Bardor, M., Varki, N., Varki, A., & Muchmore, E. (2003). Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(21), 12045-12050.
- Taschwer, M., Hackl, M., Bort, J. A. H., Leitner, C., Kumar, N., Puc, U., . . . Altmann, F. (2012). Growth, productivity and protein glycosylation in a CHO EpoFc producer cell line adapted to glutamine-free growth. *Journal of biotechnology*, 157(2), 295-303.
- Teixeira, A., Oliveira, R., Alves, P., & Carrondo, M. (2009). Advances in on-line monitoring and control of mammalian cell cultures: supporting the PAT initiative. *Biotechnology advances*, 27(6), 726-732.
- Thompson, R., Creavin, A., O'Connell, M., O'Connor, B., & Clarke, P. (2011). Optimization of the enzyme-linked lectin assay for enhanced glycoprotein and glycoconjugate analysis. *Analytical biochemistry*, 413(2), 114-122.
- Toussaint, C., Henry, O., & Durocher, Y. (2016). Metabolic engineering of CHO cells to alter lactate metabolism during fed-batch cultures. *Journal of biotechnology*, 217, 122-131.
- Townsend, R. R., & Hardy, M. R. (1991). Analysis of glycoprotein oligosaccharides using high-pH anion exchange chromatography. *Glycobiology*, 1(2), 139-147.
- Trummer, E., Fauland, K., Seidinger, S., Schriebl, K., Lattenmayer, C., Kunert, R., . . . Muller, D. (2006). Process parameter shifting: Part I. Effect of DOT, pH, and temperature on the performance of Epo-Fc expressing CHO cells cultivated in controlled batch bioreactors. *Biotechnol Bioeng*, 94(6), 1033-1044. doi:10.1002/bit.21013
- Tsuda, E., Kawanishi, G., Ueda, M., Masuda, S., & Sasaki, R. (1990). The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin. *European Journal of Biochemistry*, 188(2), 405-411.
- Vallée, C., Durocher, Y., & Henry, O. (2014). Exploiting the metabolism of PYC expressing HEK293 cells in fed-batch cultures. *Journal of biotechnology*, 169, 63-70.
- Valley, U., Nimtz, M., Conradt, H. S., & Wagner, R. (1999). Incorporation of ammonium into intracellular UDP-activated N-acetylhexosamines and into carbohydrate structures in glycoproteins. *Biotechnology and bioengineering*, 64(4), 401-417.
- van Beers, M. M., Jiskoot, W., & Schellekens, H. (2010). On the role of aggregates in the immunogenicity of recombinant human interferon beta in patients with multiple sclerosis. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 30(10), 767-775.
- Villacrés, C., Tayi, V. S., Lattová, E., Perreault, H., & Butler, M. (2015). Low glucose depletes glycan precursors, reduces site occupancy and galactosylation of a monoclonal antibody in CHO cell culture. *Biotechnology journal*, 10(7), 1051-1066.
- Walsh, G. (2014). Biopharmaceuticals Approval Trends in 2013. Tiré de <http://www.biopharminternational.com/biopharm/article/articleDetail.jsp?id=839471>

- Wang, W.-C., & Cummings, R. (1988). The immobilized leucoagglutinin from the seeds of *Maackia amurensis* binds with high affinity to complex-type Asn-linked oligosaccharides containing terminal sialic acid-linked alpha-2, 3 to penultimate galactose residues. *Journal of Biological Chemistry*, 263(10), 4576-4585.
- Wang, Z., Hilder, T. L., van der Drift, K., Sloan, J., & Wee, K. (2013). Structural characterization of recombinant alpha-1-antitrypsin expressed in a human cell line. *Analytical Biochemistry*, 437(1), 20-28. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2013.02.006>
- Weintraud, B. D., Stannard, B. S., & Meyers, L. (1983). Glycosylation of thyroid-stimulating hormone in pituitary tumor cells: influence of high mannose oligosaccharide units on subunit aggregation, combination, and intracellular degradation. *Endocrinology*, 112(4), 1331-1345.
- Wellen, K. E., Lu, C., Mancuso, A., Lemons, J. M., Ryczko, M., Dennis, J. W., . . . Thompson, C. B. (2010). The hexosamine biosynthetic pathway couples growth factor-induced glutamine uptake to glucose metabolism. *Genes & development*, 24(24), 2784-2799.
- Werner, R. G., Kopp, K., & Schlüter, M. (2007). Glycosylation of therapeutic proteins in different production systems. *Acta Paediatrica*, 96(s455), 17-22.
- Wilkens, C. A., & Gerdtzen, Z. P. (2015). Comparative Metabolic Analysis of CHO Cell Clones Obtained through Cell Engineering, for IgG Productivity, Growth and Cell Longevity. *PloS one*, 10(3), e0119053.
- Wong, C.-H. (2005). Protein glycosylation: new challenges and opportunities. *The Journal of organic chemistry*, 70(11), 4219-4225.
- Wong, N. S., Wati, L., Nissom, P. M., Feng, H., Lee, M., & Yap, M. G. (2010). An investigation of intracellular glycosylation activities in CHO cells: effects of nucleotide sugar precursor feeding. *Biotechnology and bioengineering*, 107(2), 321-336.
- Wu, A. M., Lisowska, E., Duk, M., & Yang, Z. (2009). Lectins as tools in glycoconjugate research. *Glycoconjugate journal*, 26(8), 899.
- Wu, A. M., Wu, J. H., Lin, L.-H., Lin, S.-H., & Liu, J.-H. (2003). Binding profile of *Artocarpus integrifolia* agglutinin (Jacalin). *Life sciences*, 72(20), 2285-2302.
- Wu, A. M., Wu, J. H., Liu, J.-H., & Singh, T. (2004). Recognition profile of *Bauhinia purpurea* agglutinin (BPA). *Life sciences*, 74(14), 1763-1779.
- Xie, L., & Zhou, W. (2005). Fed-batch cultivation of mammalian cells for the production of recombinant proteins. *Biotechnology and bioprocessing series*, 30, 349.
- Xu, X., Nagarajan, H., Lewis, N. E., Pan, S., Cai, Z., Liu, X., . . . Hammond, S. (2011). The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. *Nature biotechnology*, 29(8), 735-741.
- Xu, X., Wang, A. Q., Latham, L. L., Celeste, F., Ciccone, C., Malicdan, M. C., . . . Yang, N. (2017). Safety, pharmacokinetics and sialic acid production after oral administration of N-acetylmannosamine (ManNAc) to subjects with GNE myopathy. *Molecular Genetics and Metabolism*.



- Yamashita, K., Kochibe, N., Ohkura, T., Ueda, I., & Kobata, A. (1985). Fractionation of L-fucose-containing oligosaccharides on immobilized Aleuria aurantia lectin. *Journal of Biological Chemistry*, 260(8), 4688-4693.
- Yang, B., & Li, T. (2006). Effect of glycosylation at Asn302 of pro-urokinase on its stability in culture supernatant. *Chinese medical sciences journal= Chung-kuo i hsueh k'o hsueh tsa chih/Chinese Academy of Medical Sciences*, 21(2), 128-130.
- Yang, M., & Butler, M. (2000). Effects of ammonia on CHO cell growth, erythropoietin production, and glycosylation. *Biotechnology and bioengineering*, 68(4), 370-380.
- Yang, Z., & Hancock, W. S. (2005). Monitoring glycosylation pattern changes of glycoproteins using multi-lectin affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1070(1), 57-64.
- Yi, W., Clark, P. M., Mason, D. E., Keenan, M. C., Hill, C., Goddard, W. A., . . . Hsieh-Wilson, L. C. (2012). Phosphofructokinase 1 glycosylation regulates cell growth and metabolism. *Science*, 337(6097), 975-980.
- Yin, B., Gao, Y., Chung, C. y., Yang, S., Blake, E., Stuczynski, M. C., . . . Zhang, H. (2015). Glycoengineering of Chinese hamster ovary cells for enhanced erythropoietin N-glycan branching and sialylation. *Biotechnology and bioengineering*, 112(11), 2343-2351.
- Yoon, S. K., Hwang, S. O., & Lee, G. M. (2004). Enhancing effect of low culture temperature on specific antibody productivity of recombinant Chinese hamster ovary cells: clonal variation. *Biotechnology progress*, 20(6), 1683-1688.
- Yoon, S. K., Song, J. Y., & Lee, G. M. (2003). Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and bioengineering*, 82(3), 289-298.
- Zanghi, J. A., Schmelzer, A. E., Mendoza, T. P., Knop, R. H., & Miller, W. M. (1999). Bicarbonate concentration and osmolality are key determinants in the inhibition of CHO cell polysialylation under elevated pCO<sub>2</sub> or pH. *Biotechnology and bioengineering*, 65(2), 182-191.
- Zauner, G., Kozak, R. P., Gardner, R. A., Fernandes, D. L., Deelder, A. M., & Wuhrer, M. (2012). Protein O-glycosylation analysis.
- Zeng, Y., Ramya, T., Dirksen, A., Dawson, P. E., & Paulson, J. C. (2009). High-efficiency labeling of sialylated glycoproteins on living cells. *Nature methods*, 6(3), 207-209.
- Zhou, M., Crawford, Y., Ng, D., Tung, J., Pynn, A. F., Meier, A., . . . Shen, A. (2011). Decreasing lactate level and increasing antibody production in Chinese Hamster Ovary cells (CHO) by reducing the expression of lactate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinases. *J Biotechnol*, 153(1-2), 27-34. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.03.003
- Zhou, W., Rehm, J., Europa, A., & Hu, W.-S. (1997). Alteration of mammalian cell metabolism by dynamic nutrient feeding. *Cytotechnology*, 24(2), 99-108.
- Zhu, J. (2012). Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnol Adv*, 30(5), 1158-1170. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.022
- Zhu, M. M., Goyal, A., Rank, D. L., Gupta, S. K., Boom, T. V., & Lee, S. S. (2005). Effects of Elevated pCO<sub>2</sub> and Osmolality on Growth of CHO Cells and Production of Antibody-Fusion Protein B1: A Case Study. *Biotechnology progress*, 21(1), 70-77.

Ziltener, H., Clark-Lewis, I., Jones, A., & Dy, M. (1994). Carbohydrate does not modulate the in vivo effects of injected interleukin-3. *Experimental hematology*, 22(11), 1070-1075.

## **ANNEXES**

### **ANNEXE A - INVESTIGATION DE L'UTILISATION DE LA RÉSONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE ASSOCIÉE AUX LECTINES DANS LE BUT DE DÉVELOPPER UNE MÉTHODE DE SUIVI DE LA GLYCOSYLATION EN COURS DE CULTURE.**

#### **A.1 Introduction**

Produire des protéines thérapeutiques présentant des attributs de qualité optimaux représente aujourd'hui un défi important pour l'industrie biopharmaceutique (Albrecht, Hilliard, & Rudd). L'implémentation de stratégies de contrôle de la glycosylation contribuerait à améliorer la qualité et réduire la grande variabilité des glycoformes généralement observée en fin de production. Cependant, cela requiert le développement d'une méthode de suivi de la glycosylation en cours de culture. Un tel suivi en cours de culture devrait permettre de déceler les variations dans la qualité du produit et ainsi mener à l'arrêt de la culture ou à l'application de mesures correctives pour augmenter les chances d'obtenir la qualité désirée en fin de production (Teixeira et al., 2009). Malheureusement, malgré les différentes techniques d'analyse de la glycosylation qui ont été développées, aucune d'entre elles ne s'est à ce jour démarquée comme outil adéquat pour le suivi de la qualité en cours de culture. De plus, comme discuté au point 2.4.4 (page 35), les techniques généralement utilisées pour l'évaluation de la glycosylation des protéines peuvent s'avérer très fastidieuses. Elles impliquent souvent une combinaison de techniques d'analyses complexes, coûteuses et qui requièrent beaucoup de temps.

Un grand défi dans le développement d'une technique de suivi de la qualité est l'analyse de la glycoprotéine directement à partir d'un milieu complexe : le surnageant de culture. Dans ce CHAPITRE, nous évaluons l'utilisation de la résonance plasmonique de surface (SPR) en tant qu'outil de suivi de la glycosylation en cours de culture. En effet, la rapidité et la précision de l'analyse, l'absence d'étape de purification chromatographique ou de modification chimique de la glycoprotéine sont les caractéristiques conférées par la SPR que nous avons voulu exploiter dans

cette méthodologie. La stratégie consiste à capturer la protéine d'intérêt, c'est-à-dire l'interféron  $\alpha 2b$ , à partir du surnageant de culture à l'aide d'un anticorps immobilisé sur une surface SPR. Par la suite, une lectine spécifique est injectée pour sonder la glycosylation de l'interféron. Pour cette investigation, nous avons choisi d'étudier la sialylation car il s'agit d'une modification importante pour les protéines thérapeutiques recombinantes et aussi parce que la lectine spécifique à l'acide sialique, *Sambucus nigra* (SNA), est reconnue pour sa bonne spécificité.

## A.2 Matériel et méthodes

### Biosenseur et anticorps

Les expériences ont été réalisées à l'aide du biosenseur Biacore T100 (GE healthcare, Baie-d'Urfé, QC). Deux anticorps monoclonaux de capture de l'IFN $\alpha 2b$  ont été testés : l'anticorps Anti-interferon alpha 2 Antibody (KT5) (que nous appellerons anticorps KT5) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma) et l'anticorps Anti-Interferon alpha 2b antibody (4E10) (que nous appellerons anticorps 4E) (Abcam, Toronto, ON).

### Immobilisation de l'anticorps anti-IFN $\alpha 2b$ et de la lectine

L'anticorps monoclonal anti-IFN $\alpha 2b$  a été immobilisé par couplage par les liaisons amines sur une surface SPR de type CM5. Pour cela, les groupements carboxyles de la surface ont été activés par injection à 5  $\mu$ L/min pendant 7 minutes d'une solution constituée, en volume égal, de 100 mM de N-hydroxysuccinimide (NHS) et de 400 mM d'hydrochlorure de 1-Ethyl-3-carbodiimide (EDC). Par la suite, l'anticorps à une concentration de 50 mg/L dans un tampon acetate 10 mM pH 5.0 fut injecté pendant 10 minutes. Pour la surface contrôle, la même procédure a été suivie pour l'activation de la surface avant l'injection d'un anticorps anti-VEGF (R&D systems, Minneapolis, MN). Cette surface a permis de prendre en compte les interactions non spécifiques afin de les soustraire du signal obtenu lors des analyses de l'interféron  $\alpha 2b$ . Les surfaces ont été par la suite bloquées en injectant une solution d'éthanolamine 1M, pH 8.0 pendant 7 minutes. Toutes les injections lors de cette étape de préparation des surfaces ont été réalisées à 5  $\mu$ L/min. La solution tampon utilisée lors des expériences SPR fut le HBS-EP (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% v/v Surfactant P20) (GE healthcare, Baie-d'Urfé, QC).

Comme pour les anticorps, la lectine *Sambucus nigra* (SNA) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) a été immobilisée par couplage des liaisons amines sur une surface SPR de type

CM5. Pour cela, la lectine SNA à 50 mM diluée dans du tampon acétate 10 mM pH 5.0 a été injectée sur la surface activée tel que décrit précédemment.

### **Capture de l'IFN $\alpha$ 2b à partir du surnageant**

Du milieu de culture prélevé en fin de culture batch (au jour 7) de cellules HEK293 a été centrifugé à  $2000 \times g$  pendant 10 minutes. Des dilutions successives ont par la suite été réalisées avec le surnageant clarifié obtenu. Ces échantillons dilués contenant différentes concentrations en protéines ont été directement injectés à 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  pendant 60 secondes sur les surfaces CM5 contenant un anticorps anti-IFN $\alpha$ 2b immobilisé. Cela fut suivi d'une période de dissociation de 180 secondes dans laquelle, seul le tampon circule dans les cellules d'écoulement. L'évolution du signal SPR obtenu en fonction de la dilution du surnageant a été analysée.

### **Détection des glycanes à l'aide de lectines**

Avant l'injection sur les surfaces contenant le complexe anti-IFN $\alpha$ 2b/IFN $\alpha$ 2b, la lectine *Sambucus nigra* (SNA) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) a été diluée dans le tampon HBS-EP. Cette lectine spécifique à l'acide sialique a été diluée à une concentration de 15 mg/L puis injectée à un débit de 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  pendant 1 min.

### **Oxydation des glycanes de l'anticorps**

L'oxydation de l'anticorps a été réalisée *in situ* (c'est-à-dire avec l'anticorps présent sur la surface CM5) à l'aide d'une solution de periodate de sodium 10 mM (Sigma-Aldrich, Oakville, ON). La solution de periodate a été injectée sur la surface CM5 contenant l'anticorps immobilisé à un débit de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  pendant 10 min.

## **A.3 Résultats et discussion**

### **Préparation des surfaces**

Pour favoriser le bon fonctionnement de la méthode de détection, l'anticorps de capture devait présenter certaines caractéristiques. Tout d'abord, l'utilisation d'un anticorps monoclonal est le plus adapté dans le but de promouvoir une reproductibilité des résultats grâce à la capture de l'interféron  $\alpha$ 2b systématiquement au niveau des mêmes résidus sur la protéine. De plus, l'anticorps choisi devait présenter une bonne force d'interaction avec l'interféron. En effet, après capture de l'interféron, la liaison devait être suffisamment forte pour permettre l'injection de tampon et de

lectine sur le complexe anticorps/interféron sans favoriser sa dissociation. Enfin, l'anticorps de capture idéal devait ne pas être glycosylé afin de ne pas interférer avec la détection des glycans de l'interféron  $\alpha 2b$ . Cependant, comme la structure et l'épitope des anticorps commerciaux sont des informations difficilement accessibles, deux anticorps monoclonaux différents et d'épitopes inconnus ont été choisis particulièrement pour leur forte interaction avec l'IFN $\alpha 2b$ .

Par couplage des liaisons amines, il a été possible d'immobiliser l'anticorps KT5 et l'anticorps anti-VEGF à hauteur de 13000 RU et 10000 RU, respectivement (voir Figure A.1). L'anticorps anti-VEGF a été immobilisé sur la surface de référence, c'est-à-dire celle dont le signal doit être soustrait au signal de la surface contenant l'anticorps anti-IFN $\alpha 2b$  (KT5).

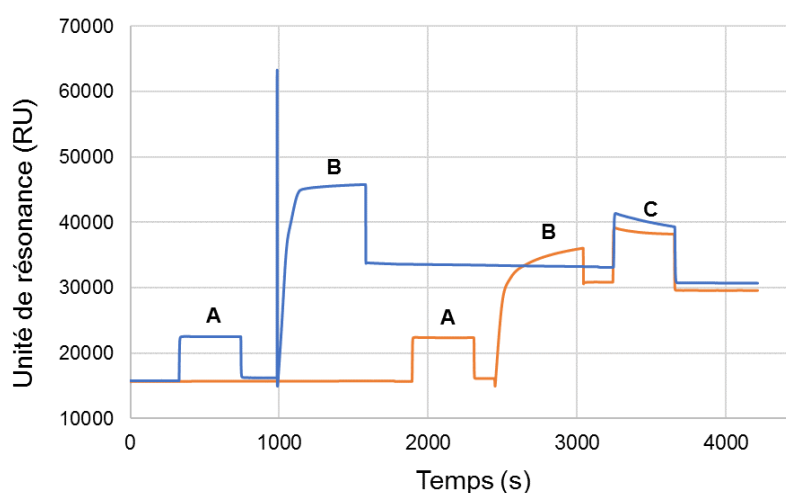


Figure A.1: Préparation des surfaces SPR. En bleu : le signal mesuré sur la surface de travail (sur laquelle est immobilisé l'anticorps anti-IFN $\alpha 2b$ ) et en orange la surface de référence. Les sensorgrammes présentent l'activation de la surface (A), l'injection des protéines à immobiliser (B) et le blocage de la surface (C).

Parmi les différentes approches de régénération des surfaces que nous avons envisagées, nous avons testé une solution de glycine 10 mM, pH 2.5 injectée à 50  $\mu$ L/min pendant 12 secondes. Cette méthode de régénération déstabilisait la surface en provoquant une dérive importante du signal. L'injection d'une solution de HCl 50 mM à 50  $\mu$ L/min pendant 12 secondes a donné de meilleurs résultats et cela a été utilisé pour les expériences.

### Capture de l'interféron $\alpha 2b$ : test de l'anticorps

Avant d'analyser un surnageant de culture, nous avons voulu vérifier la capacité de l'anticorps KT5 à capturer la protéine d'intérêt en injectant de l'IFN $\alpha 2b$  pur à plusieurs concentrations sur la surface. Il a été démontré que l'anticorps KT5 peut interagir avec l'interféron sur une gamme de concentration assez étendue. De plus, l'interaction était suffisamment forte pour qu'une grande proportion de l'interféron capturé reste liée à l'anticorps après l'injection de l'échantillon (voir Figure A.2). Enfin, nous avons observé que le niveau d'interaction était bien dépendant de la concentration de l'échantillon injecté.

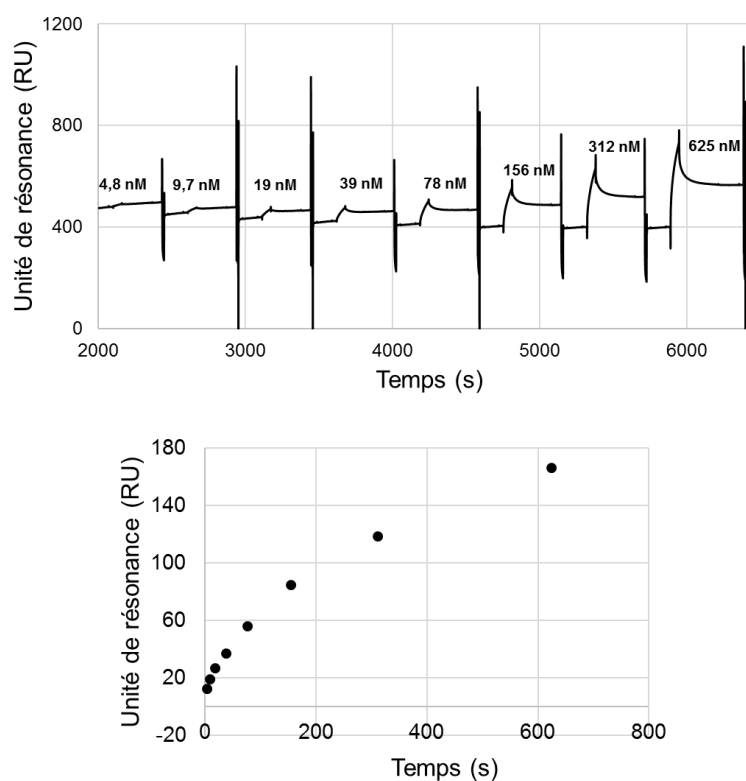


Figure A.2 : Capture de l'interféron  $\alpha 2b$  pur par l'anticorps KT5. La protéine a été injectée à différentes concentrations sur la surface SPR. Le niveau d'interaction, choisi comme étant le signal à la fin de la phase de dissociation, a évolué proportionnellement à la concentration en IFN $\alpha 2b$  injectée.

Après avoir vérifié le bon fonctionnement de l'anticorps KT5 dans le cas d'échantillons d'IFN $\alpha 2b$  purs, nous avons analysé plusieurs dilutions d'un surnageant de culture. Il fut possible de capturer l'interféron  $\alpha 2b$  de manière proportionnelle à sa concentration dans le surnageant (voir Figure A.3). De plus, comme observé pour les échantillons purs, les protéines capturées le furent

de manière stable par l'anticorps car une grande fraction de celles-ci est restée liée après la phase d'association.

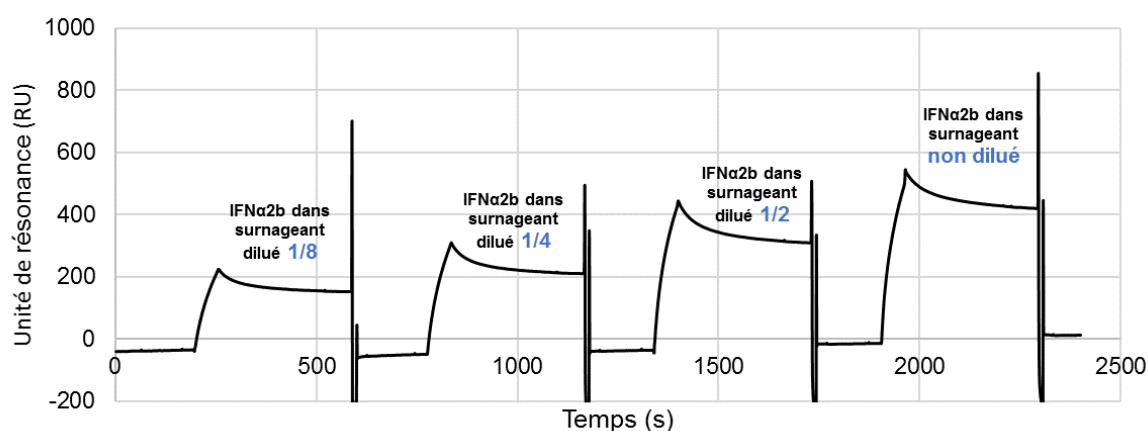


Figure A.3 : Capture de l'IFNα2b à partir du surnageant de culture.

Une quantité suffisante d'IFNα2b doit être disponible pour interagir avec la lectine. L'anticorps KT5 a présenté une très bonne d'interaction avec l'interféron, ce qui a permis de passer à l'étape suivante, c'est-à-dire la vérification de l'interaction entre la lectine SNA et les acides sialiques portés par les glycoformes de l'IFNα2b.

### Capture de l'interféron α2b : test de la lectine SNA

Bien que l'interaction entre une lectine et un glycan puisse varier significativement en fonction du partenaire immobilisé (voir le point 2.5.3.1), nous avons néanmoins évalué la capacité de la lectine SNA à lier l'acide sialique de l'IFNα2b dans une configuration dans laquelle la lectine est immobilisée par couplage des liaisons amines sur la surface SPR.

L'injection d'une solution d'IFNα2b pure a permis d'observer le signal résultant de la liaison entre la lectine et les acides sialiques de l'interféron. L'injection à la même concentration d'IFNα2b non-glycosylée n'a donné lieu à aucun signal, confirmant ainsi la spécificité de la lectine SNA pour l'IFNα2b glycosylé (voir la Figure A.4).



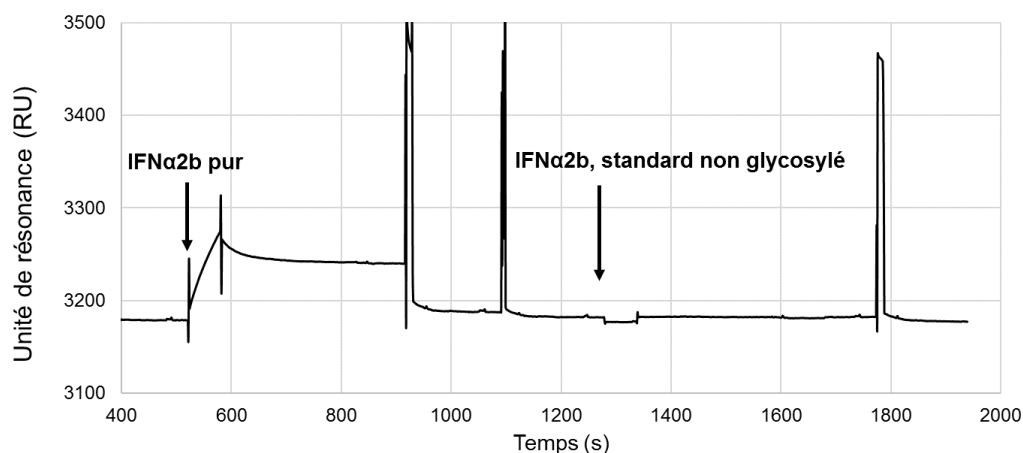


Figure A.4: Test de la lectine SNA. L'IFN $\alpha$ 2b pur provenant des cultures de la lignée HEK293 et l'IFN $\alpha$ 2b commercial produit dans *E.coli* ont été injectés sur une surface SPR sur laquelle la lectine SNA a été immobilisée.

### Détection des glycanes à l'aide de la lectine

De nouveau, pour la détection des glycanes à l'aide de la lectine, nous avons dans un premier temps testé le système à partir d'une solution d'IFN $\alpha$ 2b purifié. Tout d'abord, l'IFN $\alpha$ 2b pur dilué à 150 nM dans le tampon d'analyse (HBS-EP) fut injecté sur la surface contenant l'anticorps KT5. Cela a permis de capturer environ 100 RU d'IFN $\alpha$ 2b. Après la phase de dissociation, la lectine SNA fut injectée sur la surface contenant le complexe anticorps/IFN $\alpha$ 2b. Cela a donné lieu à une seconde évolution du signal caractérisée par une augmentation linéaire du signal pendant la phase d'association suivie par une très faible perte de signal pendant la phase de dissociation. Cela suggère que les lectines se sont liées fortement car elles se dissocient très peu après la fin de l'injection.

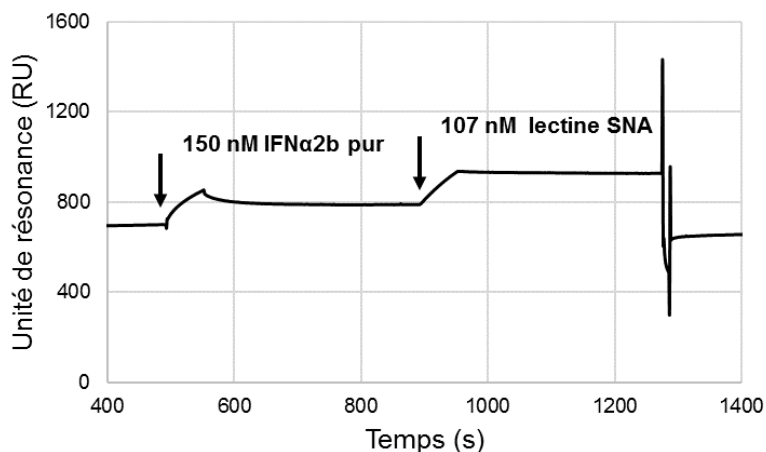


Figure A.5: Capture de l'IFN $\alpha$ 2b à partir d'une solution pure et injection de la lectine SNA pour la détection d'acide sialique.

Nous avons ensuite vérifié si le système fonctionnait avec du surnageant de culture et si le signal correspondant à la liaison avec la lectine était bien dépendant de la concentration en interféron capturé. Pour cela, du surnageant issu de la culture de la lignée HEK293 produisant l'IFN $\alpha$ 2b a été injecté à plusieurs dilutions sur l'anticorps KT5. Cela fut suivi par l'injection de la lectine SNA à 107 nM (voir la Figure A.5). Bien que nous ayons observé précédemment que le signal correspondant à l'interaction anticorps/IFN $\alpha$ 2b évolue de manière dépendante de la dilution du surnageant, le signal correspondant à la liaison de la lectine/IFN $\alpha$ 2b est resté inchangé. En effet, à peu près 50 RU de lectine SNA s'est lié au complexe anticorps/IFN $\alpha$ 2b peu importe la quantité d'IFN $\alpha$ 2b présente sur la surface (voir la Figure A.6). Cela a suggéré que la lectine interagit avec des glycans présents sur l'anticorps de capture ce qui pourrait interférer avec le signal correspondant aux glycans de l'IFN $\alpha$ 2b. En effet, nous avons testé par la suite l'injection de la lectine SNA directement sur la surface contenant uniquement l'anticorps (non lié à l'IFN $\alpha$ 2b) et un signal d'intensité similaire (RU max) fut observable (résultat non montré). Étant donné que le profil de glycosylation de cet anticorps commercial nous était inconnu, il existait un risque d'interférence avec les acides sialique présents sur l'anti-IFN $\alpha$ 2b.

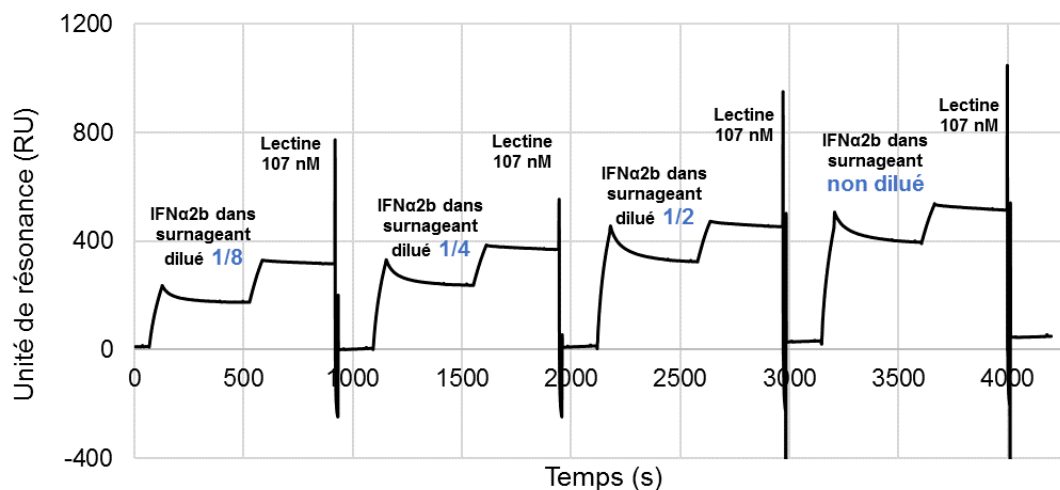


Figure A.6 : Capture de l'IFNα2b à partir du surnageant suivie de l'injection de la lectine SNA pour détecter l'acide sialique.

L'oxydation douce à l'aide du periodate de sodium est une méthode utilisée pour modifier de manière sélective les glycanes des protéines (De Bank, Kellam, Kendall, & Shakesheff, 2003; Zeng, Ramya, Dirksen, Dawson, & Paulson, 2009). Dans le cas de la sialylation, cette technique permet de faire apparaître des groupements aldéhyde sur les résidus acide sialique, ce qui empêche la liaison à la lectine SNA (Gornik & Lauc, 2008). Ainsi, pour se débarrasser de l'interférence due aux acides sialiques présents sur les glycanes de l'anticorps de capture, nous avons oxydé *in situ* l'anticorps KT5 à l'aide de l'injection de periodate de sodium à 10 mM. Comme illustré à la Figure A.7, l'oxydation de l'anticorps n'a pas eu d'impact néfaste sur la capacité de celui-ci à capturer l'interféron. De plus, cela a effectivement permis de supprimer l'interaction entre la lectine SNA et l'anticorps. Malheureusement, après cette opération, l'injection de la lectine SNA sur le complexe anticorps/interféron n'a produit aucun signal.

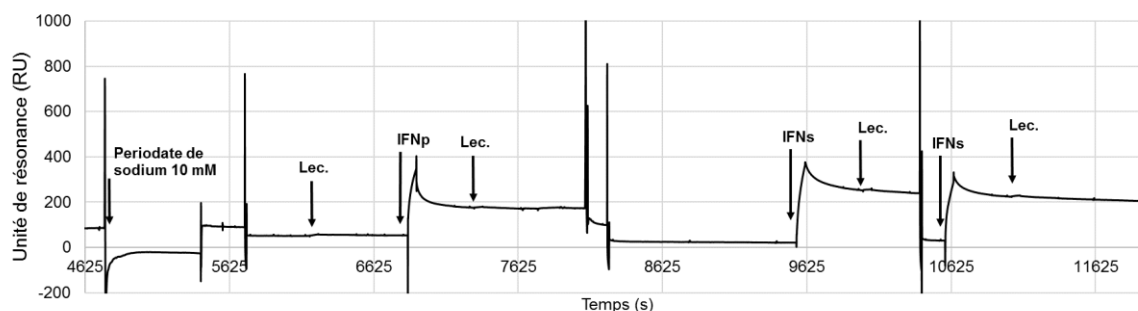


Figure A.7 : Oxydation douce de l'anticorps de capture à l'aide de periodate de sodium. **IFNp** dénote l'injection d'IFN $\alpha$ 2b pur et **IFNs** l'injection de surnageant de culture. **Lec.** Indique l'injection de lectine, **Periodate**, l'injection de la solution d'oxydation.

Comme nous avons vérifié précédemment la capacité de la lectine SNA à se lier aux glycanes de l'interféron, l'incapacité de notre système à détecter la glycosylation de l'IFN $\alpha$ 2b pourrait s'expliquer par un problème d'encombrement stérique, rendant le glycan inaccessible pour la lectine SNA. En effet, le site de glycosylation de l'interféron pourrait se trouver dans la région (ou une région très à proximité) de celle reconnue par l'anticorps, se retrouvant ainsi inaccessible pour la lectine lors le complexe anticorps/IFN $\alpha$ 2b est formé.

Cela fut vérifié à l'aide d'un système inverse à celui réalisé précédemment. Nous avons immobilisé la lectine SNA sur la surface SPR. Ensuite, nous avons injecté une solution pure d'interféron suivi par l'injection de l'anticorps anti-IFN $\alpha$ 2b KT5 (voir Figure A.8). Cette expérience a confirmé le problème d'encombrement stérique, puisque l'anticorps fut incapable de se lier de manière efficace à la protéine. La légère augmentation de signal que nous avons observée correspond à la liaison anticorps/lectine plutôt que anticorps/IFN $\alpha$ 2b, comme nous l'avons vérifié en injectant directement l'anticorps sur la lectine immobilisée.

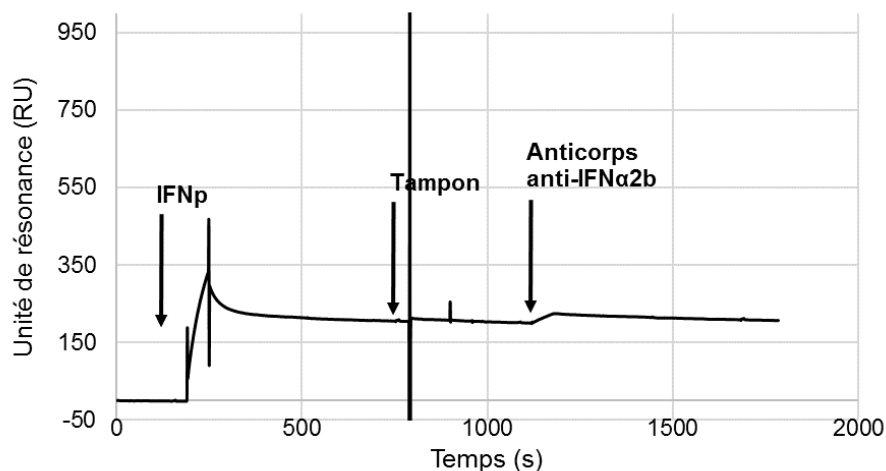


Figure A.8 : Système inversé pour confirmer l'encombrement stérique

Dans un dernier effort pour améliorer le système, nous avons partiellement dénaturé l'interféron. La protéine IFN $\alpha$ 2b possède 2 ponts disulfures intermoléculaires. Nous avons voulu tester si la mise en condition réductrice, permettrait à la protéine d'adopter une conformation permettant une plus grande disponibilité de son site de glycosylation pour la lectine. Bien que cette opération ait permis d'améliorer significativement la quantité d'interféron capturée par l'anticorps (environ 5 X plus), elle n'a malheureusement pas résolu le problème d'encombrement stérique (résultat non montré).

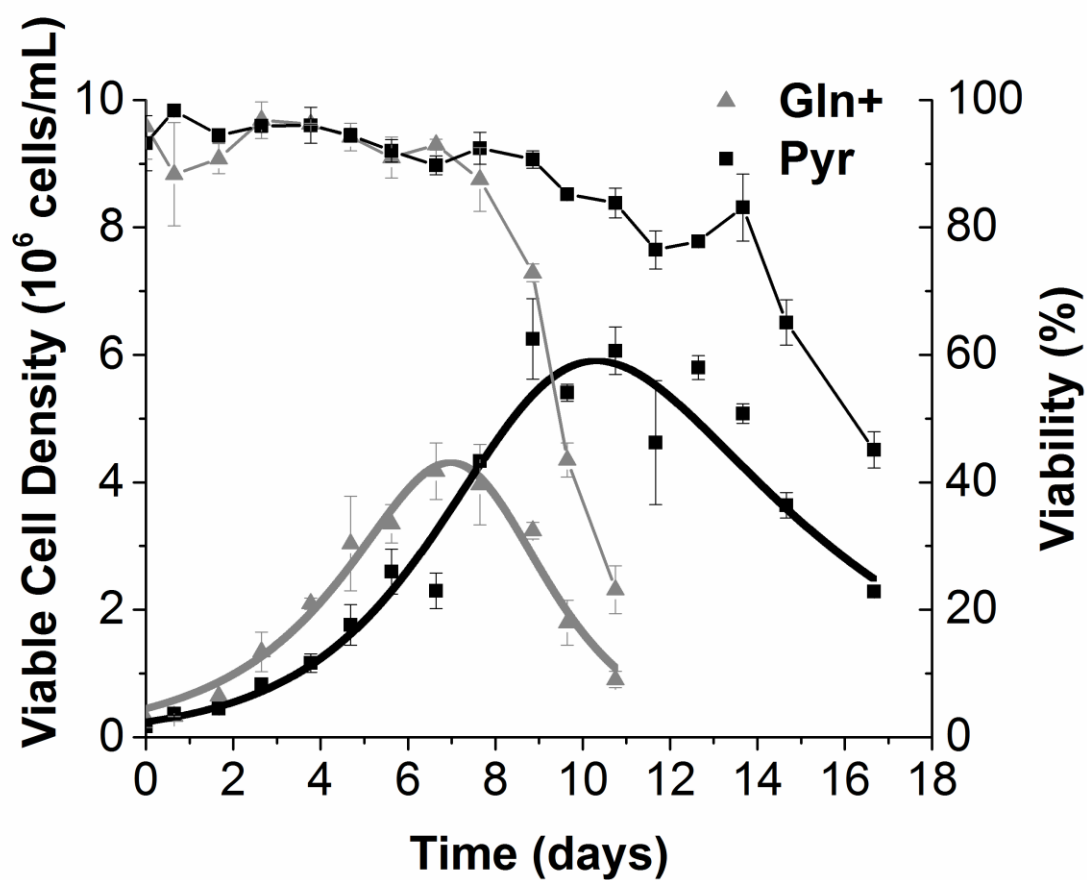
Ce problème d'encombrement stérique fut aussi rencontré avec le second anticorps anti-IFN $\alpha$ 2b (l'anticorps 4E) testé.

Le poids moléculaire moyen d'un anticorps est d'environ 150 kDa. Cela correspond également au poids moléculaire de la lectine SNA. Il est fort envisageable que, par encombrement stérique, le faible poids moléculaire de l'interféron  $\alpha$ 2b (environ 20 kDa) ne permette pas à celui-ci de former facilement des liaisons avec deux partenaires de haut poids moléculaires comme l'anticorps et la lectine SNA.

## A.4 Conclusion et perspectives

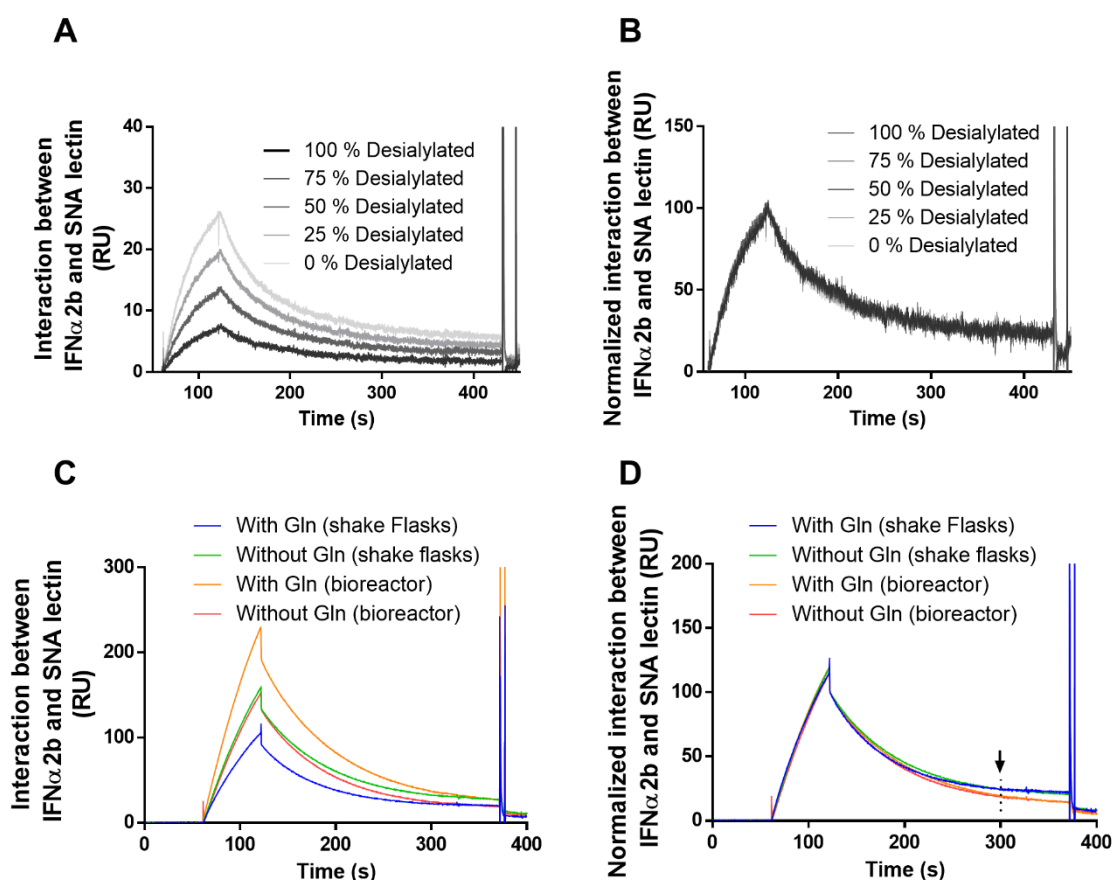
Cette étude souligne l'importance de la structure des partenaires impliqués pour le fonctionnement du système proposé. Nous avons vu que la capture de la protéine d'intérêt à l'aide d'un anticorps peut poser le problème d'interférence causé par les glycans de celui-ci. Cependant, nous avons montré que l'oxydation à l'aide du periodate de sodium peut aider à réduire significativement l'interaction des acides sialiques avec la lectine SNA sans affecter la capacité de l'anticorps à capturer l'IFN $\alpha$ 2b. Bien que le système n'ait pas fonctionné pour l'IFN $\alpha$ 2b avec les anticorps testés, nous pensons toutefois que celui-ci reste très intéressant et mérite d'être étudié éventuellement avec d'autres stratégies pour capturer la protéine d'intérêt. Il serait par exemple intéressant de fusionner la protéine recombinante avec une étiquette poly-histidine ou une biotine dans le but de la capturer à l'aide d'un anticorps anti-histidine ou une streptavidine immobilisée sur la surface SPR. Cela réduirait grandement les risques d'encombrement stérique en laissant la protéine entièrement libre pour interagir avec les lectines. Dans le cas de l'étude de la glycosylation des anticorps, on pourrait envisager une capture de ceux-ci à partir du surnageant à l'aide de la protéine A ou d'un récepteur immobilisé sur la surface. Ainsi, des études sont encore à réaliser pour le développement d'un système précis et polyvalent permettant le suivi la glycosylation en cours de culture. Néanmoins, la technique de résonance plasmonique de surface reste un outil prometteur pour le développement de cette méthode de suivi de la qualité en cours de procédé.

## ANNEXE B : INFORMATION SUPPLÉMENTAIRE DE L'ARTICLE 2



**Figure A1:** Batch cultures of the HEK293-6E cell clone with glutamine (Gln+) and without glutamine but with pyruvate (Pyr). Cells were cultured in Freestyle F17 media without glutamine (Gln-) or supplemented 10 mM pyruvate (Pyr).

# ANNEXE C : INFORMATION SUPPLÉMENTAIRE DE L'ARTICLE 3



**Figure A2:** Analysis of the interaction between IFN $\alpha$ 2b and SNA lectin. Raw sensorgram data of the interaction of SNA lectin with pure IFN $\alpha$ 2b at different desialylation levels (A). Normalized sensorgram data of the interaction of SNA lectin with pure IFN $\alpha$ 2b at different desialylation levels (B). Raw sensorgram data of the interaction of SNA lectin with pure IFN $\alpha$ 2b from the cultures with and without glutamine (C). Normalized sensorgram data of the interaction of SNA lectin with pure IFN $\alpha$ 2b from the cultures with and without glutamine (D). The SPR response corresponding to the 300-s time point in panel D (see arrow) was used as an indication of the SNA/IFN $\alpha$ 2b complex stability and thus of the type of sialylation pattern on IFN $\alpha$ 2b.